

筑波大学

博士（医学）学位论文

Abnormal pyramidal decussation and  
bilateral projection of the corticospinal  
tract axons in mice lacking the heparan  
sulfate endosulfatases, Sulf1 and Sulf2

(へパラン硫酸エンドスルファターゼ *Sulf1/Sulf2*

二重欠損マウスにおける皮質脊髓路の

錐体交叉異常と両側神経支配の解明

および運動機能異常の解析)

2020

筑波大学

相澤哲史

## 目次

1. 要約	P. 5
2. 序論	
2.1. 皮質脊髄路形成を制御する分子機構	P. 7
2.2. ヘパラン硫酸エンドスルファターゼによる脱硫酸化とシグナル調節	P. 10
2.3. 先行研究で明らかにされた <i>Sulf1/2</i> DKO マウス胎児脳のパ質脊髄路形成異常	P. 13
2.4. 本研究の目的	P. 15
3. 対象と方法	P. 16
4. 結果	
4.1. PKC $\gamma$ 染色による <i>Sulf1/2</i> DKO 成獣マウス脳のパ質脊髄路の解析	P. 30
4.2. <i>Sulf1/2</i> DKO 成獣マウス脳における皮質脊髄路線維の順行性トレーシング	P. 31
4.3. <i>Sulf1/2</i> DKO マウス脊髄における皮質脊髄路線維の両側性投射	P. 34
4.4. <i>Sulf1/2</i> DKO マウス皮質脊髄路の位置特異的な投射	P. 37
4.5. <i>Sulf1/2</i> DKO マウス一次運動野の電気刺激による両側性反応	P. 38
4.6. <i>Sulf1/2</i> DKO マウスにおける微細運動の異常	P. 39
5. 考察	
5.1. 錐体交叉異常を引き起こすメカニズム	P. 44
5.2. 脊髄側索を下行する皮質脊髄路線維	P. 48
5.3. 皮質脊髄路の脊髄への両側性投射	P. 49

5.4. 運動機能異常	P. 51
6. 謝辞	P. 54
7. 出典	P. 55
8. 参考文献	P. 56
9. 図の説明	P. 69
10. 図表	

## 略号一覧

ABC, avidin-biotin-peroxidase complex: アビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合体

AP, anterior-posterior: 前後 (方向)

BDA, biotinylated dextran amine: ビオチン化デキストランアミン

CMM, congenital mirror movement: 先天性鏡像運動症

CST, corticospinal tract: 皮質脊髄路

DAB, 3,3'-diaminobenzidine: ジアミノベンジジン

DF, dorsal funiculus: 後索

DKO, double knockout: ダブルノックアウト

DMSO, dimethyl sulfoxide: ジメチルスルホキシド

DV, dorsal-ventral: 背腹 (方向)

EMG, electromyogram: 筋電図

HS, heparan sulfate: ヘパラン硫酸

i.p., intraperitoneal: 腹腔内 (投与)

KO, knockout: ノックアウト

LF, lateral funiculus: 側索

M1, primary motor cortex: 一次運動野

ML, medial-lateral: 内外側 (方向)

PBS, phosphate-buffered saline: リン酸緩衝生理食塩水

PBT, PBS with 0.1% Tween-20

PFA, paraformaldehyde: パラホルムアルデヒド

PKC $\gamma$ , protein kinase C gamma: プロテインキナーゼ C ガンマ

ROI, region of interest: 関心領域

Sulf1, Sulfatase 1

TBS, Tris-buffered saline: トリス緩衝生理食塩水

TBST, Tris-buffered saline supplemented with 0.1% Tween-20

TSA, tyramide signal amplification: チラミドシグナル増幅

## 1. 要約

皮質脊髄路は随意運動の制御に重要な役割を果たしている。皮質脊髄路は脳皮質から脊髄に至る長距離の神経路であり、発達段階で正しく軸索を誘導するために多数の軸索ガイダンス分子が必要とされる。先行研究において、ヘパラン硫酸エンドスルファターゼ、*Sulf1* および *Sulf2* 遺伝子を欠損させたダブルノックアウト (double knockout, DKO) マウス胎児脳で、皮質脊髄路が中脳側面を背側に向かって異常に伸長することが示された。しかし、先行研究で用いた C57BL/6 系統の DKO マウスは生後すぐに死亡するため、皮質脊髄路の生後の発達、特に錐体交叉と脊髄への投射は解析できなかった。

最近 C57BL/6 と CD-1/ICR の混合遺伝的背景にすると *Sulf1/2* DKO マウスが成獣まで生存することが分かったため、本研究では成獣 DKO マウスにおける皮質脊髄路の構造と機能を解析することを目的とした。皮質脊髄路の染色および順行性トレーシングの結果、*Sulf1/2* DKO マウスでは皮質脊髄路の成熟後も中脳表面で皮質脊髄路線維が背側に偏位する異常が持続していることが分かった。また、錐体交叉では正中近くに位置する線維が正常に正中を交叉する一方で、より外側に位置する線維が同側を伸長していることが明らかとなった。脊髄では交叉線維が対側の後索を下行し対側の灰白質に正常に入るのに対し、非交叉線維は同側の側索を下行し同側の灰白質に入ることから、DKO マウスでは脳の一侧から起始した皮質脊髄路線維が脊髄に両側性に投射していることが示された。さらに、野生型マウスでは一侧運動野の微小刺激が対側でのみ前肢筋の筋電図

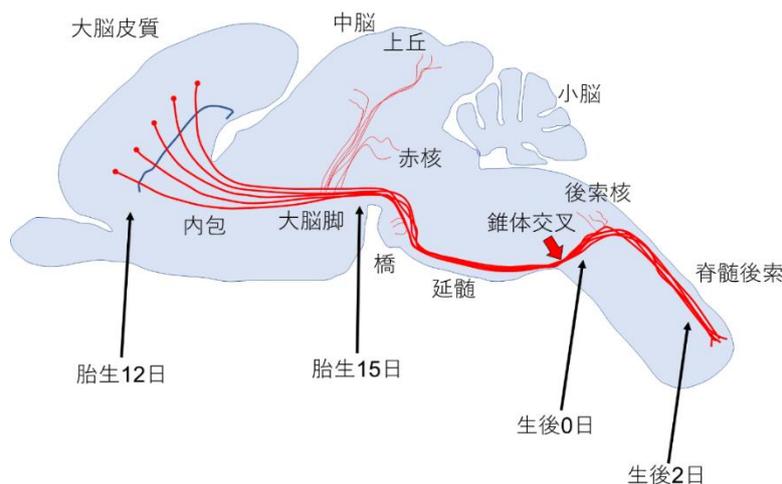
反応を誘発するのに対し、DKO マウスでは同刺激が両側性の筋電図反応を誘発したことから、皮質脊髄路が両側の運動ニューロンと機能的な連絡があることが示唆された。

*Sulf1/2* DKO マウスの皮質脊髄路の異常による機能的影響についてマウスの運動機能評価に用いられるグリッドウォーキング試験、ステアケース試験、シングルペレットリーチング試験を利用して解析した。野生型マウスと比較して、*Sulf1/2* DKO マウスではこれらの試験で成績が低下しており、運動機能に障害があることが示唆された。以上の研究結果から *Sulf1/2* 遺伝子の破壊により皮質脊髄路の解剖学的異常に加えて機能的異常も生じていることが明らかとなった。

## 2. 序論

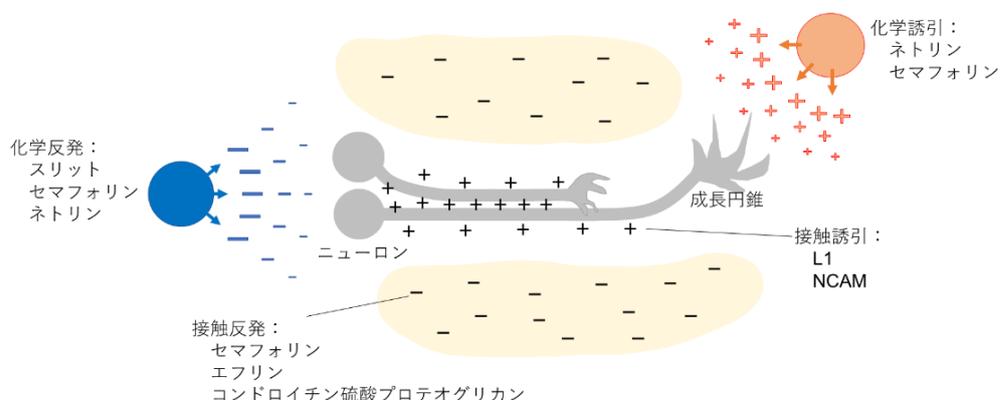
### 2.1. 皮質脊髄路形成を制御する分子機構

皮質脊髄路は随意運動のための主要な下行路であり、大脳皮質が脊髄の神経活動を制御するために主な役割を担っている (Lemon, 2008; Welniarz et al., 2017a)。皮質脊髄路は感覚運動皮質 V 層の錐体細胞に起始し、その線維は内包、大脳脚を通過して延髄腹側を伸長し錐体路を形成した後、げっ歯類では錐体交叉で背側に向かいながら正中を交叉し、反対側の脊髄後索を下行する【参考 1】。ヒトでも脳内では同様の解剖学的経路を通過するが、正中交叉後に脊髄側索を下行する点がげっ歯類と異なっている。また、ヒトの皮質脊髄路は運動ニューロンに直接投射する線維があるのに対し、げっ歯類では脊髄灰白質の背側部および中間部に投射し、介在ニューロンを介して運動ニューロンの活動を制御している。

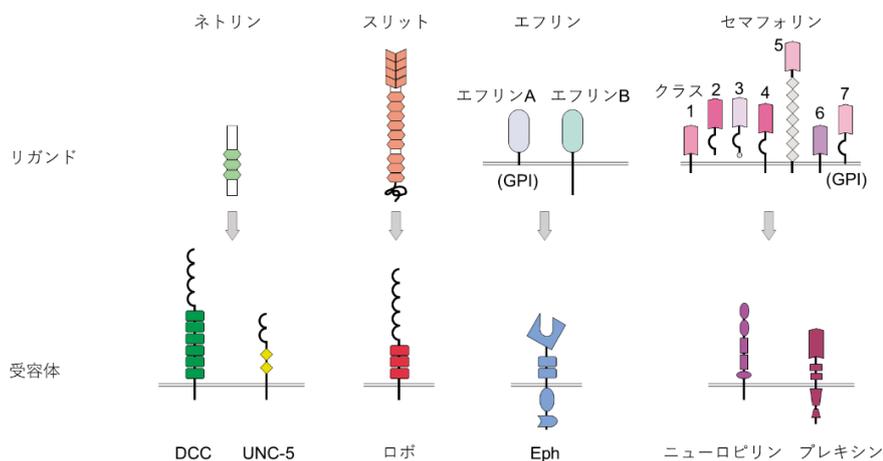


**【参考 1: げっ歯類の皮質脊髄路: Welniarz et al., 2017a より改変】** 皮質脊髄路軸索は、胎生 12 日頃に大脳皮質 V 層の錐体細胞から伸長し始める。胎生 15 日頃に大脳脚を経て延髄錐体路を下行し、生後 0 日に錐体交叉 (赤矢印) に達する。皮質脊髄路は経路の途中で側枝を上丘、赤核、後索核に伸ばす。

発生期の神経系では、神経軸索の成長円錐が誘引性／反発性の軸索ガイダンス分子によって正しい領域に向かって伸長することで、神経回路が形成される【参考 2, 3】。皮質脊髓路の軸索は発達の段階で長距離を伸長するため、正しく標的まで誘導するのに多くの軸索ガイダンス分子が必要とされる (Canty and Murphy, 2008; Leyva-Díaz and López-Bendito, 2013; Welniarz et al., 2017a)。



**【参考 2: 神経軸索ガイダンス: Tessier-Lavigne and Goodman, 1996 より改変】**

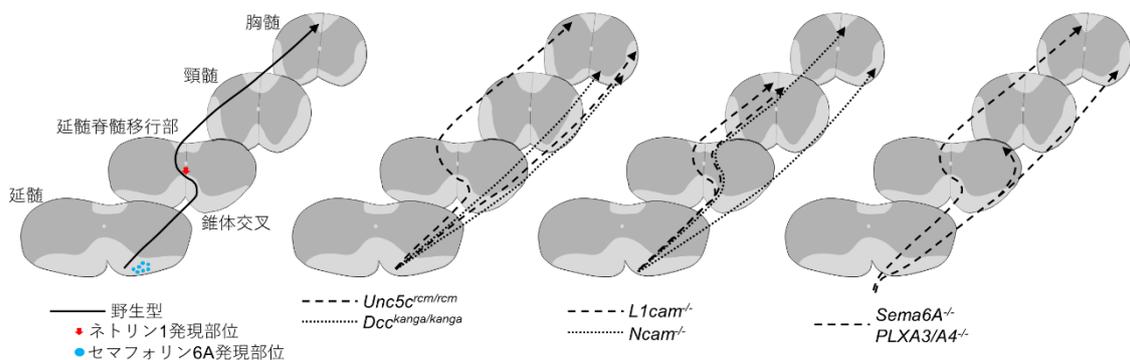


**【参考 3: 軸索ガイダンス分子と受容体: Yu and Bargmann, 2001 より改変】**

例えば、皮質脊髓路軸索が脳脚を正しく伸長するためには、視床下部で発現するスリットが受容体のロボを発現する皮質脊髓路軸索を反発することが必要である。実

際、スリットのノックアウト (knockout, KO) マウスでは皮質脊髓路軸索が視床下部へ侵入し、異常な正中交叉を示すことが分かっている。また、ネトリン1とその受容体 DCC/Unc5、セマフォリン 6A とその受容体プレキシシン A3/A4、細胞接着分子 L1 および NCAM は錐体交叉の形成に関与しており、様々な交叉異常がそれぞれの KO マウスで観察される (Dahme et al., 1997; Cohen et al., 1998; Fransen et al., 1998; Finger et al., 2002; Rolf et al., 2002; Faulkner et al., 2008; Rünker et al., 2008) 【参考 4】。

脊髄では、長軸に沿って Wnt の濃度勾配が存在し、吻側から尾側にかけて Wnt の発現が減少していくが、Wnt が受容体 Ryk を介して軸索を反発することで発現が低い尾側に軸索を伸長させる (Liu et al., 2005)。エフリンとその受容体 Eph は脊髄内での投射部位の分布や正中交叉の制御に関与しており、EphA4 KO マウスでは錐体交叉で交叉し後索を下行してきた線維が、脊髄内で正中を再交叉する異常が観察される (Dottori et al., 1998; Yokoyama et al., 2001; Kullander et al., 2001a, 2001b)。

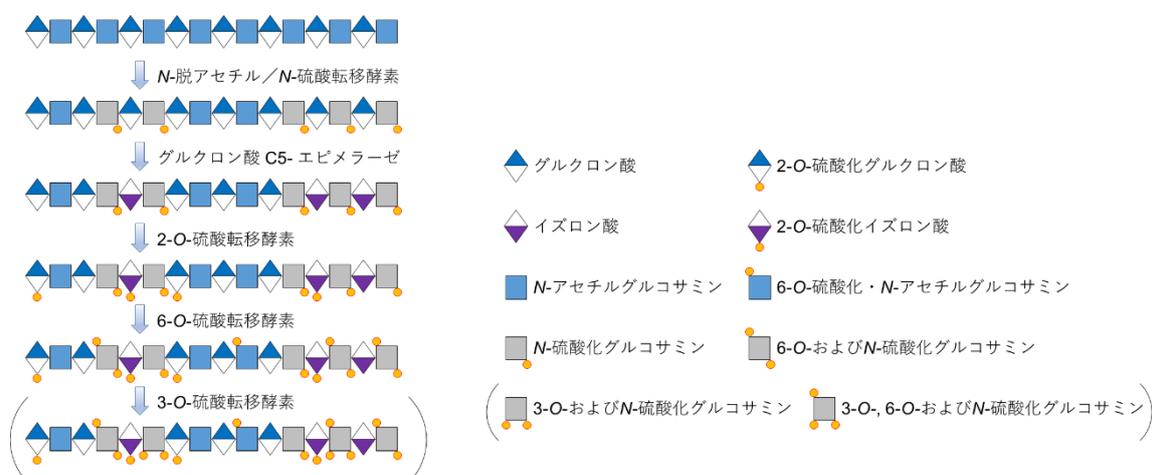


**【参考 4: 錐体交叉に関わる軸索ガイダンス分子: Canty and Murphy, 2008 より改変】**

錐体交叉付近における野生型および遺伝子変異マウスの皮質脊髓路を示す。

## 2.2. ヘパラン硫酸エンドスルファターゼによる脱硫酸化とシグナル調節

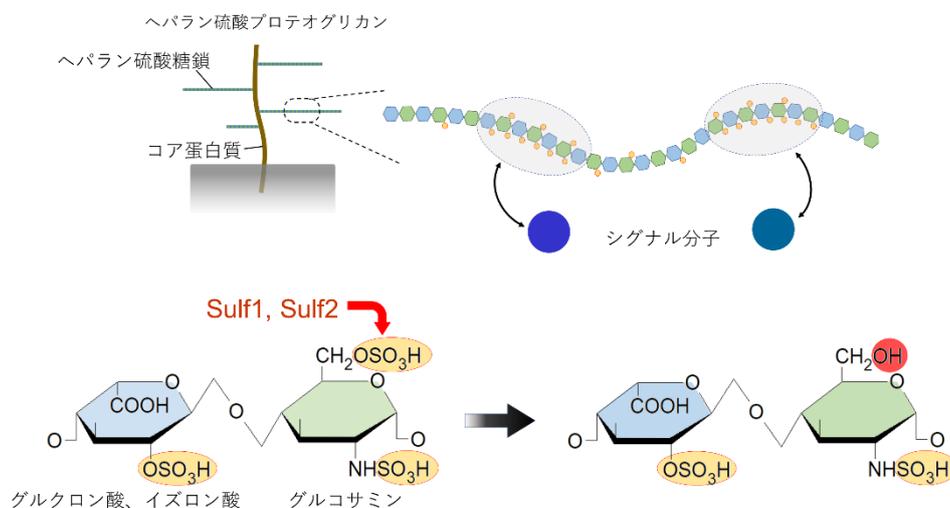
ヘパラン硫酸は大部分の動物組織の細胞表面と細胞外マトリックスに普遍的に存在する糖鎖で、生体内ではコア蛋白質と共有結合した状態のヘパラン硫酸プロテオグリカンとして存在する (Perrimon and Bernfield., 2000)。ヘパラン硫酸プロテオグリカンが有する多様な生理機能は、ヘパラン硫酸と様々な細胞外シグナル分子や細胞外マトリックス分子が相互作用することによって発揮される。ヘパラン硫酸はグルコサミンとウロン酸 (グルクロン酸もしくはイズロン酸) の二糖単位の繰り返しによる直鎖状の糖鎖であり、ゴルジ体で合成・修飾される。糖転移酵素 Ext によって *N*-アセチルグルコサミンとグルクロン酸の二糖単位の 50-100 回に及ぶ繰り返しが形成されたあと、複数の硫酸転移酵素および異性化酵素により修飾を受け、*N*位の脱アセチル化/硫酸化、グルクロン酸からイズロン酸への異性化、2位、6位の硫酸化が続けて行われる (また稀に3位の硫酸化が行われる) (Lee and Chien, 2004) 【参考5】。ヘパラン硫酸プロテオグリカ



【参考5: ヘパラン硫酸の合成過程における糖鎖修飾: El Masri et al., 2017 より改変】

ンはこの合成過程が完了した後に輸送され細胞膜や細胞外に局在する。この硫酸化修飾は糖鎖全体で均一に起こる訳ではなく、ヘパラン硫酸内部には高度に硫酸化された領域（S-ドメイン）と硫酸基の少ない領域が存在する（Lamanna et al., 2007; Bishop et al., 2007）。ヘパラン硫酸はS-ドメインに多く存在する硫酸基の陰性電荷を介して様々なシグナル分子と結合することが知られている（Pratt et al., 2006; Masu, 2016; El Masri et al., 2017）。

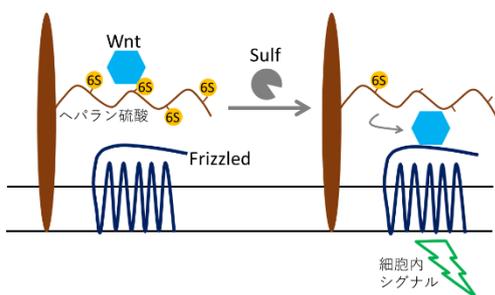
ヘパラン硫酸エンドスルファターゼ Sulfatase 1 (Sulf1) および Sulfatase 2 (Sulf2) は細胞外に分泌される酵素で、2位、6位、N位の3か所に硫酸基を持つ二糖単位の連なりを認識し6位の硫酸基を選択的に脱硫酸化する活性を持つ（Seffouh et al., 2013）。このような構造はS-ドメインに豊富に存在するため、Sulf1 および Sulf2 はS-ドメインを脱硫酸化することで、ヘパラン硫酸とシグナル分子との相互作用を変化させ、シグナル伝達を正もしくは負に調節している（El Masri et al., 2017）【参考6】。



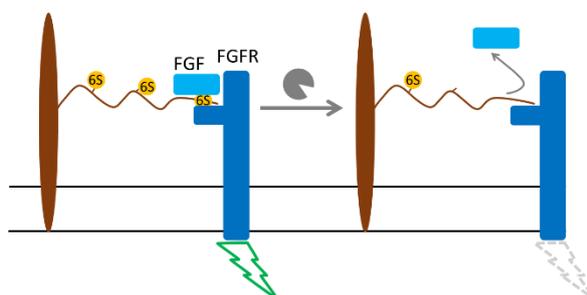
【参考6: Sulf1 および Sulf2 によるヘパラン硫酸の脱硫酸化: Masu, 2008 より改変】

例えば、Suf11 のウズラにおける相同遺伝子 *QSulf1* に関する研究では、モルフォゲンである Wnt のシグナルを Sulf が正に調節していることが報告されている (Ai et al., 2003)。Sulf を発現していない細胞では Wnt が 6 位の硫酸化されたヘパラン硫酸と高い親和性を示し、その受容体である Frizzled と反応することが妨げられているが、Sulf 発現細胞では 6 位の脱硫酸化により Wnt とヘパラン硫酸の親和性が減少し、その結果 Wnt/Frizzled の複合体が形成される【参考 7A】。逆に Sulf がシグナル伝達を負に調節する例として、線維芽細胞増殖因子 (fibroblast growth factor, FGF) のシグナルが挙げられる (Wang et al., 2004)。FGF はヘパラン硫酸と FGF 受容体 (FGF receptor, FGFR) と三量体を形成することでシグナルを下流に伝える。Sulf 発現細胞では 6 位が脱硫酸化されることでこの複合体形成が減少し、シグナル伝達を負に調節されている【参考 7B】。

(A) Sulf がシグナルを正に調節する



(B) Sulf がシグナルを負に調節する

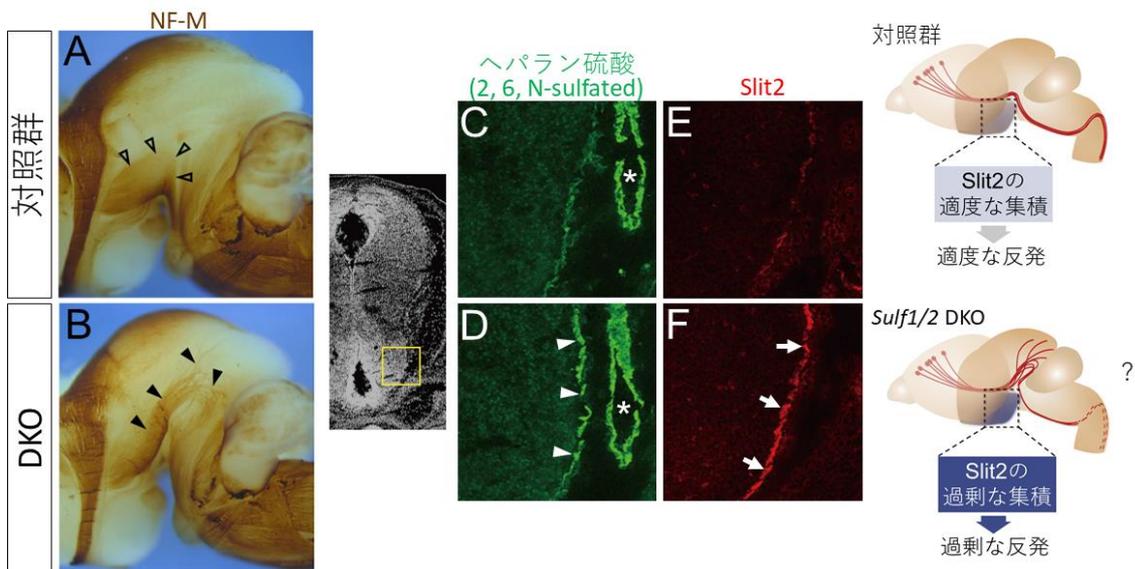


【参考 7: Sulf による脱硫酸化を介したシグナル調節: El Masri et al., 2017 より改変】

### 2.3. 先行研究で明らかにされた *Sulf1/2* DKO マウス胎児脳の皮質脊髄路形成異常

ヘパラン硫酸が様々な軸索ガイダンス分子と相互作用すること、糖転移酵素 Ext1 の KO マウスではヘパラン硫酸が欠損した結果、神経回路形成異常が起こることなどから、ヘパラン硫酸が神経発生に重要であることが示されている。しかし神経回路形成におけるヘパラン硫酸の脱硫酸化修飾の重要性については不明であった。そこで先行研究において *Sulf1* および *Sulf2* の KO マウスを作製したところ、単独 KO (*Sulf1* KO および *Sulf2* KO) マウスの神経発生は正常だったが、*Sulf1/2* ダブルノックアウト (double knockout, DKO) マウスでは皮質脊髄路の形成に異常があることが胎児脳で見出された (Okada et al., 2017)。ニューロフィラメント-M のホールマウント染色を行った胎生 18.5 日の脳を側方から観察すると、対照群マウスでは皮質脊髄路は大脳脚を通過し、橋へと向かう (【参考 8A】白抜き矢じり)。一方、DKO マウスでは皮質脊髄路軸索が中脳表面を背側に異常に伸長した後、大部分が脳幹に戻ることが明らかになった (【参考 8B】黒矢じり)。さらに、皮質脊髄路軸索が大脳脚を通過する胎生 15.5 日において、大脳脚の腹側領域の脳表で 3ヶ所が硫酸化されたヘパラン硫酸のシグナルが対照群と比較して DKO マウスで増加していた (【参考 8C-D】白矢じり)。また DKO マウスの同部位において反発性軸索ガイダンス分子であるスリット 2 蛋白が増加していた (【参考 8E-F】白矢印)。以上の結果から DKO マウスでは視床下部で過剰に硫酸化されたヘパラン硫酸が増え、そこにスリット 2 が結合し局所的に異常に集積した結果、皮質脊髄

路軸索が強い反発を受け背側に向かって伸長することが明らかとなった（【参考 8】）。これとは対照的にスリット 2 の KO マウスでは反発作用が欠損することにより、皮質脊髓路軸索が脳腹側に侵入する表現型を示す（Bagri et al., 2002）。従って、Sulf1/2 がヘパラン硫酸を脱硫酸化することによってスリット 2 の分布を適切なレベルに調節し、視床下部での適度な軸索の反発をもたらし皮質脊髓路の軸索ガイダンスに寄与していると考えられた。



**【参考 8: Sulf1/2 DKO 胎児脳での皮質脊髓路形成異常: Okada et al., 2017 より改変】**

胎生 18.5 日における対照群および DKO マウスの皮質脊髓路の走行、胎生 15.5 日における大脳脚の腹側領域のスリット 2 蛋白と 3 箇所が硫酸化されたヘパラン硫酸の局在を示す。3 箇所が硫酸化されたヘパラン硫酸のシグナルは DKO マウスの脳腹側表面で増強しているが、血管（アステリスク）では変化しない。C57BL/6 純系の DKO マウスは生後 1 日以内に死亡するため、生後に完成する錐体交叉や脊髓内の皮質脊髓路（右下模式図の ? 部分）の解析はできなかった。

## 2.4 本研究の目的

皮質脊髄路は随意運動に重要な経路であり、マウスでは皮質脊髄路の形成異常や損傷が巧緻運動障害を引き起こすことが知られている (Starkey et al., 2005; Jakeman et al., 2006; Welniarz et al., 2017b)。したがって、DKO マウスの皮質脊髄路軸索が生後にどのような経路を伸長するのか、完成した皮質脊髄路が正しく運動制御できるのかを調べることは皮質脊髄路の形成過程や機能を知る上で重要である。マウスの皮質脊髄路は出生時に延髄尾側に到達する (Canty and Murphy, 2008) 【参考 1】が、先行研究で用いた C57BL/6 の遺伝的背景を有する DKO マウスは生後 1 日以内に死亡するため、皮質脊髄路の生後発達、特に錐体交叉と脊髄への投射は解析できなかった【参考 8】。最近、理由は不明であるが *Sulf1/2* DKO マウスが CD-1/ICR 系統と交雑した後に成獣まで生存することが発見された。そこで本研究では、混合遺伝的背景の *Sulf1/2* DKO マウスを用いて、生後に発達する錐体交叉と脊髄への投射がどのようになっているか、また皮質脊髄路の機能異常について解析することとした。

### 3. 対象と方法

#### 実験動物（成獣マウス）

定法に従い 129/Ola 由来 ES 細胞を用いた相同組み換えにより *Sulf1* と *Sulf2* ノックアウトマウスを作製し、C57BL/6N 系統に 5 世代戻し交配を行い N5 世代とした (Nagamine et al., 2012)。これらと非近交系である CD-1/ICR 系統とを交配したものを F1 世代とし、さらに F1 世代と上記 C57BL/6N の N5 世代とを交配したものを F2 世代とした。本研究では、C57BL/6N 系統と CD-1/ICR 系統の混合遺伝的背景（≒50%:50% あるいは 75%:25%）である F1 および F2 世代を実験対象とした。尾から単離したゲノム DNA を用いて PCR 法で遺伝子型を決定し、別途記載のない限りは野生型とダブルノックアウト（DKO）マウスを実験対象とした。全ての動物実験は筑波大学動物実験委員会により承認され、筑波大学動物実験取扱規定を遵守して行った。

#### 脳および脊髄切片の前処理

ペントバルビタールの腹腔内過量投与（400 mg/kg 体重）による深麻酔を行い疼痛反応の消失を確認してから、リン酸緩衝生理食塩水（phosphate buffered saline, PBS）に溶解した 4%パラホルムアルデヒド（paraformaldehyde, PFA）で灌流固定を行った。脳と脊髄を取り出し、4°Cで同固定液に一晩浸漬した。PBS で 3 回洗浄後に凍結保護のため

に 20%スクロース PBS 溶液に浸漬し、O.C.T. compound (サクラファインテックジャパン、東京、日本) に凍結包埋した。クリオスタットで 50 μm 厚の冠状断切片を作製し、PBS 内に回収し浮遊切片法で以下の前処理を行った。PBS で 3 回、PBT (PBS + 0.1% Tween 20) で 1 回洗浄後に、25%、80%メタノール/PBT 溶液そして 80%メタノール/20%ジメチルスルホキシド (DMSO) 溶液で順に脱水を行った。内因性ペルオキシダーゼ活性を不活化するために 3% 過酸化水素/80% メタノール/20% DMSO 溶液で 30 分間反応させ、再水和後に以下の各工程に進んだ。

## 免疫組織化学

以下の方法でプロテインキナーゼ C ガンマ (protein kinase C gamma, PKC $\gamma$ ) の免疫組織化学染色を行った (Okada et al., 2019)。15-16 週齢のマウスの脳切片を 0.5%ブロッキング試薬 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) PBT 溶液に溶解した抗 PKC $\gamma$  抗体 (1:200; フロンティア研究所、北海道、日本) と 4°C で 2 晩反応させた。PBT で 15 分ずつ 6 回洗浄し、0.5%ブロッキング試薬 PBT 溶液に溶解したビオチン化抗ウサギ IgG 抗体 (1:600; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) と 2 時間反応させた。PBT で 15 分ずつ 5 回、トリス緩衝生理食塩水 (Tris-buffered saline, TBS) に 0.1% Tween-20 を添加した溶液 (TBST) で 1 回洗浄後に avidin-biotin peroxidase complex (ABC; Vectastain Elite ABC kit; Vector Laboratories) に 30 分間反応させた。1% Tween-20/TBS 溶液で 20 分洗

浄後にさらに TBST で 20 分ずつ 2 回洗浄し、同じ溶液で 4°C で一晩保持した後、3,3'-diaminobenzidine (DAB; Vector Laboratories) に 10 分間反応させ発色した。別途記載のない限り、上記の工程は室温で行った。

### 皮質脊髄路の順行性トレーシング

皮質脊髄路の順行性トレーシングをビオチン化デキストランアミン (biotinylated dextran amine, BDA) を用いて以下のとおり行った。雌雄いずれかの成獣マウス (9-45 週齢、17.1-53.3 g) をペントバルビタール (50 mg/kg 体重) の腹腔内投与により麻酔し、定位固定装置 (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA) に固定した。頭皮切開後に歯科用ドリルで穿頭し、硬膜を除去してから右半球の感覚運動皮質の標的領域に Neuros syringe (model 75RN; Hamilton Laboratories, Reno, NV, USA) を刺入した。定位座標 (ブレグマより前後方向 [anterior-posterior; AP]; 正中より内外側方向 [medial-lateral; ML]; 軟膜表面より背腹方向 [dorsal-ventral; DV], 単位 mm) を前肢領域は+1.2 AP, +1.5 ML, 0.7 DV に、後肢領域は-1.2 AP, +1.0 ML, 0.7 DV に設定した。系統的解析では、+1.2, 0, -1.2 AP の前後方向と、0.5 から 3.0 ML の内外側方向に割り振って定位座標を設定した。BDA (10,000 MW, lysine-fixable; Molecular Probe, Eugene, OR, USA) を PBS に 10% に溶解し、0.5  $\mu$ l を 5 分かけて上記座標に注入した。注入終了後 5 分経ってから、

Neuros syringe 先端をゆっくりと大脳皮質から抜き、閉創後にマウスをホームケージに戻した。

脳および脊髄内で標識された神経線維を調べるため、脳の解析では注入から 8 日後、脊髄の解析では注入から 15 日後にそれぞれ 4%PFA/PBS による灌流固定を行った。脳切片に関しては、前述した前処理後に、ABC に 30 分間反応させてから、DAB に 20 分間室温で反応させ発色した。脊髄切片（概ね頸髄は C2 レベル、腰髄は L1-3 レベル）に関してはさらにチラミドによるシグナル増幅（tyramide signal amplification, TSA）を行った。脊髄切片を ABC に反応させた後、ビオチンチラミド（TSA Biotin system; PerkinElmer, Waltham, MA, USA）に 10 分間反応させ、TBST で洗浄後に再度 ABC に 30 分間反応させた。TBST で洗浄後に DAB で 20 分間反応し発色させシグナルを検出した。浮遊切片を MAS コートスライドガラス（松浪硝子工業、大阪、日本）に貼り付け、エタノール系列で脱水、キシレンで透徹、Poly-mount（Polysciences, Warrington, PA, USA）で封入し、顕微鏡（Axioplan 2; Carl Zeiss Microscopy, Jena, Germany and BZ-8000; キーエンス、大阪、日本）を用いて観察と撮影を行った。BDA が適切な部位に注入されていることを染色した切片の観察により全例で確認した。

### 三次元再構成

PKC $\gamma$ 免疫組織化学染色もしくは BDA トレーシングを行った脳の連続切片の二次元画像を切片の外形とシグナル部位を基準にして AutoAligner alignment software (Bitplane, Zürich, Switzerland) を用いて位置合わせを行った。位置合わせされた一連の画像データを Imaris software (Bitplane) に読み込み三次元画像に転換させた (Okada et al., 2019)。

### 標識された神経線維の定量化

脊髄内の BDA で標識された神経線維の分布を調べるために、脊髄切片の BDA シグナルを画像解析ソフトウェア ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>) を用いて定量化した。冷却 CCD カメラ (VB-1000, キーエンス) を取り付けた顕微鏡 (Axioplan 2) の 5 倍対物レンズで明視野のデジタル画像を取得し、8-bit グレースケールの白黒反転画像に変換した。背景信号の閾値を ImageJ の自動閾値設定方法の 1 つである Triangle アルゴリズム (Zack et al., 1977) を用いて決定した。閾値以上を示すシグナル強度の合計である integrated density を関心領域 (region of interest; ROI) 内でそれぞれ測定した。下行する神経路のシグナルを定量化する解析では、白質と灰白質の境界が明瞭である暗視野画像を用いて対側後索 (contralateral dorsal funiculus, cDF) と同側側索 (ipsilateral lateral funiculus, iLF) の外形に合わせて ROI を設定した (図 8A)。頸髄と腰髄の対側後索 (cDF) および同側側索 (iLF) の integrated density の合計で、個々の ROI の integrated density を除し、個々の ROI が占める割合 (integrated density [%]) を計算した。対側およ

び同側の灰白質のシグナルを定量化する際は、灰白質を右半部と左半部に二分割して解析した。背腹軸方向に沿ってシグナルを定量化する際は、灰白質を背腹軸方向に四分割し、背側四半部、中間部、腹側四半部のそれぞれ左右両側をまとめて ROI を設定した (図 8A)。灰白質内の integrated density の合計で個々の ROI の integrated density を除し、個々の ROI が占める割合を計算した。

#### 皮質内微小電気刺激による筋電図記録

皮質内微小電気刺激による筋電図記録を以前に報告された方法を用いて行った (Li and Waters, 1991; Serradj et al., 2014; Gu et al., 2017; Ueno et al., 2018)。硫酸アトロピン (0.05 mg/kg 体重) を腹腔内投与後に、ケタミン (100 mg/kg 体重) を腹腔内投与して麻酔し、術中はイソフルラン吸入を併用した。術中および記録中に痛みによる反射や自発的な動きが見られた場合には上記の 1/5 量のケタミンを追加で投与した。マウスを定位置固定装置 (成茂科学器械研究所、東京、日本) に固定し開頭した。ポリウレタンコートの同軸型微小電極 (径 200  $\mu\text{m}$ 、先端抵抗 50 k $\Omega$ ; ユニークメディカル、東京、日本) を運動皮質 (+0.75 AP, +1.5 ML, 0.6–1.0 DV) に挿入し、パルス発生器 (SEN-7013M; 日本光電、東京、日本) とアイソレーター (SS-401J, 日本光電) を用いて 1 秒ごとに 14 連の矩形波の電流刺激 (持続時間 200  $\mu\text{s}$ 、刺激間隔 3-ms、333Hz、20–100  $\mu\text{A}$ ) を与えた。上記の刺激により前肢の動きが観察された時に、筋電図反応を下記の方法で記録し

た。ニクロム線電極（先端 0.5 mm の絶縁膜除去）を両側の上腕二頭筋と三頭筋に刺入し、増幅器（MEG-6108, 日本光電）の低域遮断周波数を 150 Hz、高域遮断周波数を 3 kHz にそれぞれ設定し、4 連の矩形波の電流刺激（持続時間 200  $\mu$ s、刺激間隔 3 ms、20–100  $\mu$ A）を 550 ms 毎に運動皮質に与えた際の筋電図反応を、AD 変換器（model 1401 plus; Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK）と Spike2 software（ver. 7.2; Cambridge Electronic Design）を用いて記録した。微小刺激により誘発された 500 回分の筋電図を整流化してから加算平均した。実験終了後に刺激部位の記録のため直流電流によるマーキング（20  $\mu$ A, 10 s）を置き、マウスを深麻酔後に 4%PFA/PBS で灌流固定し脳を組織学的に観察し刺激部位を確認した。

### グリッドウォーキング試験 (Grid-walking test)

グリッドウォーキング試験を以前に報告された方法に従って行った (Starkey et al., 2005)。雄マウス（11–12 週齢）を高さ 50 cm に設置した格子状の網（方形 32  $\times$  20 cm、格子の幅 11  $\times$  11 mm）に乗せて 3 分間自由に探索させ、その行動をデジタルカメラ（EX-FR100; カシオ計算機、東京、日本）を用いて每秒 30 フレームで撮影した。マウスの遺伝型を盲検化した状態の検者が撮影されたビデオを観察し、網の面より下方に肢を踏み外す foot fault（図 13A）の回数を計測した。この試験においてマウスは後肢よりも前肢をおよそ 4 倍の比率で多く動かしたため、左右両側を合わせて前肢は初めの

200 歩、後肢は初めの 50 歩を別々に解析した。踏み外し回数を前肢の場合は 200、後肢の場合は 50 で除すことにより踏み外しの割合 (foot fault [%]) を計算した。

### ステアケース試験 (Staircase test)

ステアケース試験を以前に報告された方法に従って行った (Montoya et al., 1991; Baird et al., 2001)。マウス用のステアケース試験装置 (model 80301) をメルクエスト (富山、日本) より購入した。試験装置は透明で蝶番式の蓋の付いたスタート部分に、マウスが乗れる台座が中央に縦長に設置された狭い回廊部分が連結された構造になっており、台座の両端と回廊の壁の空間に左右階段状のステップが挿入できるようになっている (図 13C')。着脱式の階段状ステップは左右それぞれ 8 段からなり、各段の浅く掘られたくぼみに餌ペレット (Dustless Precision pellet, 20 mg; Bioserv, Flemington, NJ, USA) を置くことができるようになっている (図 13C)。マウスは回廊内では振り向いて戻ることはできないため、左右それぞれのステップに置かれたペレットは同じ側の前肢でしか取れない。

まず 11-12 週齢の雄マウスをペレットに馴化させるため、体重 g あたり 1 日 55 mg のペレットをホームケージに入れ、これを 3 日間継続した。その翌日に左右の各ステップに 2 ペレットずつと台座上に 4 ペレットを乗せた試験装置にマウスを 30 分間入れて馴

化させた。その日以降は毎日テスト前 18-20 時間の絶食時間を設けた。翌 4 日間のテストでは、両側のステップの下 7 段に 1 ペレットずつ乗せた状態から開始し、マウスに 30 分間自由に回廊に入り前肢を伸ばしてペレットをとり食べるようにさせた。テスト終了後に残っているペレットの数とそのステップを記録し、後述の指標を計算して運動機能を評価した。多くのマウス（野生型で 6 匹中 5 匹、DKO で 6 匹中 6 匹）が直接舌を使って 2 段目のペレットを得たため、2 段目のペレットに関しては集計に入れなかったが、2 段目のペレットを置かずにいると 3 段目以降のペレットに前肢を伸ばす意欲も減じるように見られたため、2 段目にもペレットを置いた状態で実験を行った。「獲得したペレット数」（number of pellets collected、得点範囲 0~12）は両側の 3~8 段目に置いた総ペレット数（12）から残ったペレット数を差し引いて計算され、マウスが食べることに成功したペレット数を示す。「到達した最大距離」（maximum distance reached、得点範囲 0~6）は、ペレットを食べた、落とした、弾いたかどうかに関わらずマウスが到達した最も深い（左右でより深いほうの）段を示し、得点 1 は 3 段目、得点 6 は 8 段目にそれぞれ該当する。「成功率」（success rate [%]）は「獲得したペレット数」をマウスが左右でそれぞれ到達したステップ数の合計で除して計算した。マウスの行動は事後検証のためデジタルカメラで記録した。

#### シングルペレットリーチング試験 (Single pellet-reaching test)

シングルペレットリーチング試験を以前に報告された方法に従って行った (Farr and Whishaw, 2002; Chen et al., 2014)。アクリル製の透明な四角い筒状の枠 (外径: 高さ 20 cm、奥行き 15 cm、幅 8.5 cm、5 mm 厚) に 3 つの縦に開けたスリット (高さ 13 cm、幅 0.5 cm) を備えた試験装置を用いた (図 14A)。スリットは枠の前面に中央スリット 1 つと、反対面に外側スリット 2 つ (中央より 2.5 cm 外側) を設置した。まず 13-15 週齢の雄マウスを餌ペレットに馴化させるため、体重 g 当たり 1 日 55 mg のペレット (Dustless Precision pellet, 20 mg, Bioserv) をホームケージ入れ、これを 2 日間継続した。翌日は試験装置枠内に 20 ペレットを入れ、マウスをその内部で 20 分間馴化させた。その日より自由摂食時の体重の約 90% を維持できるように飼料の量を調節した。翌日よりシェイピング期間を開始し、試験装置枠の中央スリットの前にペレットを満たした傾斜付きのペレット皿を置き、枠内にマウスを入れ左右の前肢をペレットに伸ばすようにさせた。20 回の手を伸ばす動作 (リーチ動作) が見られた時点でシェイピングが達成されたとみなしシェイピング期間を終了としたが、20 分以内に 20 回のリーチが達成されなかった場合には翌日もシェイピング期間を継続とした。5 日以内にシェイピングを達成できなかったマウスは以降のテストから除外した (野生型マウス 10 匹中 1 匹、DKO マウス 11 匹中 1 匹が除外された)。シェイピング期間でより多く使用した前肢を利き肢と判定し以降の試験期間に移行した。各マウスがシェイピングを達成した翌

日から 8 日間の試験期間を開始し、1 日当たり 1 試験を行った。原因不明であるが一匹の野生型マウスがシェイピング達成後に死亡したため以降の解析より除外した。

試験装置の 2 つの外側スリットのある面を下に向けて置き、その前に保持台（高さ 10 mm）を設置してから、枠内にマウスを入れ試験期間を開始した。ペレットを確実に同じ場所に置くために、外側スリットの中心から 4 mm 内側、枠の前壁内面より 6.5 mm 前方にペレットを置く左右 2 つの窪みを保持プレート上に設置し、利き腕側の窪みにペレットを 1 つ置くこととした。マウスはペレットに前肢を伸ばす際に前肢を内側に回内させるため、窪みを内側にずらして設置することで利き腕の使用を促すようにした。1 日当たりの試験時間は 30 回のリーチ動作が見られるか、20 分の制限時間を超過するかのいずれかで終了とした。マウスの行動はデジタルカメラを用いて毎秒 30 フレームで撮影し事後解析に使用した。リーチ動作を success, drop, loss, failure の 4 種類に分類した。ペレットを首尾よく掴んで口に運んだ場合は success、ペレットを掴んでスリットを通過させたものの口に入れる前に枠内に落とした場合は drop、ペレットを掴んだもののスリット通過前に枠外に落とした場合は loss、空振りや触れるのみ、弾くなどペレットを掴むことができなかった場合には failure と分類した。最終的に口に運べたかどうかに関わらず、ペレットを掻き出す動作も含めてペレットを掴んでいなければ failure と分類した。総リーチ数で success, drop, loss, failure それぞれの数を除してそれぞれのリーチ動作の割合（rate per attempts [%]）を計算した。

前肢によるリーチ動作の軌道の解析では、記録された動画から各マウスで5回の成功したリーチ動作を解析対象とした。DKO マウス 1 匹を除いた全てのマウスで、全試験期間中に少なくとも 5 回の成功したリーチ動作が確認されており、最終日に 5 回以上成功したマウスではその日の最初の 5 回成功分を、最終日の成功が 5 回未満だったマウスでは前日の分も含めて 5 回の成功分を解析対象とした。画像解析ソフトウェア ImageJ のプラグインである MTrackJ (<https://imagescience.org/meijering/software/mtrackj/>; Meijering et al., 2012) を用いて、第二指先端、第二中手指節関節、手関節の位置をそれぞれフレーム毎にマークし、それぞれの軌道を算出した。リーチ動作の速度分布の解析では、成功したリーチ動作の録画記録のうちペレットを掴む瞬間のフレームとその前後 2 フレームずつを含めた連続 5 フレームを用いて、第二指先端の位置を各フレームで点  $P_1 \sim P_5$  としてそれぞれマークし、2 点間の距離から速度 ( $v_i$  は 2 点  $P_i, P_{i+1}$  間の速度を示す) を算出した。

### ロタロッド試験 (Rotarod test)

ロタロッド装置 (ENV-577; Med Associate Inc, Fairfax, VT, USA) を用いてロタロッド試験を行った。5 列に仕切られた回転する車軸の棒に 5 匹のマウスを乗せ、落下するまでの時間を測定した。5 分間かけて 4 rpm から 40 rpm に加速する回転速度の設定で、1 日当たり 3 回の試験を 2 日連続で行い計 6 回の試験を行った。

### **オープンフィールド試験 (Open field test)**

角型オープンフィールド (OF-36(M)SQ; 500 × 500 mm, 壁高 400 mm; 室町機械、東京、日本) とビデオトラッキングシステム (ANY-maze; Stoelting, WoodDale, IL, USA) を用いてオープンフィールド試験を行った。各マウスにフィールド内を 30 分間自由に歩かせ、移動距離を計測した。

### **ホットプレート試験 (Hot plate test)**

ホットプレート試験を以前に報告された方法に従って行った (O'Callaghan and Holtzman, 1975)。17–18 週齢の雄マウスを 55°C に維持したホットプレート (FHP-450; 東京硝子器械、東京、日本) に置き、肢をなめる、擦り合わせる、もしくはジャンプするまでの潜時 (秒) を記録した。

### **統計解析**

全ての統計的検定は統計ソフト Prism 4.0c (GraphPad Software; San Diego, CA, USA) を用いて行った。有意水準  $P < 0.05$  とし、両側検定を行った。BDA トレーシング分

析、ステアケース試験、シングルペレットリーチング試験、オープンフィールド試験、  
ロタロッド試験の統計的有意差は一元配置もしくは二元配置の反復測定分散分析もしくは  
二元配置分散分析と、ボンフェローニ法による事後検定で評価した。またグリッドウ  
ォーキング試験、ホットプレート試験、リーチ動作における速度分布解析では統計的有  
意差をマン・ホイットニーの U 検定で評価した。

## 4. 結果

### 4.1. PKC $\gamma$ 染色による *Sulf1/2* DKO 成獣マウス脳の皮質脊髄路の解析

まず、皮質脊髄路の全ての線維を概観する目的で、成獣での皮質脊髄路マーカーであるプロテインキナーゼ C ガンマ (protein kinase C gamma [PKC $\gamma$ ]) の免疫組織化学染色を行った (Mori et al., 1990; Ding et al., 2005; Joshi et al., 2008)。野生型マウスにおいて皮質脊髄路線維は前脳尾側から中脳腹側で大脳脚を形成し (図 1A<sub>1</sub>-C<sub>1</sub>)、橋に向かって腹内側方向に伸長した後 (図 1D<sub>1</sub>-F<sub>1</sub>)、延髄では束化して錐体路を形成する (図 2A<sub>1</sub>)。その後、線維は正中に接近し (図 2B<sub>1</sub>)、錐体交叉で背側に伸長しながら正中を交叉し (図 2C<sub>1</sub>-D<sub>1</sub>)、脊髄の対側後索に入る (図 2E<sub>1</sub>)。DKO マウスでは、中脳腹側までの軸索走行はほぼ正常だったが、より尾側で中脳表面を背側に伸長する異常な線維が観察された (図 1E<sub>2</sub>-F<sub>2</sub>)。また、視床で本幹からそれた少数の線維が上丘内部を伸長する異常も認められた (図 1B<sub>2</sub>'-E<sub>2</sub>', 矢じり)。延髄では錐体路が側方に扁平に広がり (図 2A<sub>2</sub>-B<sub>2</sub>)、正中近くの線維が正中を交叉する一方で、外側に位置する線維は同側の延髄腹外側表面を伸長した (図 2C<sub>2</sub>-D<sub>2</sub>)。

正中交叉の全体像を把握するために PKC $\gamma$  染色をした脳切片から皮質脊髄路の経路の三次元再構成を行った。野生型マウスでは皮質脊髄路の線維は正中近くを下行してから錐体交叉で対側に交叉し (図 2G-H)、大部分の線維が後索に入る一方で少数の線維が背外側皮質脊髄路 (Steward et al., 2004) を形成してより外側の灰白質内を下行する

(dorsolateral corticospinal tract, dlcs; 図 2E<sub>1</sub>, H) 様子が明瞭となった。対照的に、DKO マウスでは内側に位置した線維が正中を交叉する一方で、外側にそれた線維が正中交叉をせずに同側を下行した (図 2K-L)。この *Sulf1/2* DKO マウスの錐体交叉での異常の程度は個体によって差があり、また交叉線維と非交叉線維の割合は左右でも違いが見られた (図 2J-L, 図 3)。延髄錐体路と正中との距離を測定した結果、内側縁と正中との距離は野生型マウス (3匹の6つの皮質脊髄路から算出、図 2I) で  $161.1 \pm 18.7 \mu\text{m}$ 、DKO マウス (3匹の6つの皮質脊髄路より算出、図 2M) で  $414.1 \pm 17.6 \mu\text{m}$  であった。また、延髄錐体路の外側縁と正中との距離は野生型マウスで  $693.0 \pm 14.2 \mu\text{m}$ 、DKO マウスで  $1212.6 \pm 28.1 \mu\text{m}$  であった (図 2I, M)。さらに、DKO マウスの正中交叉する線維に注目し、その外側縁と正中との距離を測定したところ、 $765.3 \pm 36.9 \mu\text{m}$  であり、野生型マウス延髄錐体路の外側縁と正中との距離 ( $693.0 \pm 14.2 \mu\text{m}$ ) に近いことが分かった (図 2I, M)。

#### 4.2. *Sulf1/2* DKO 成獣マウス脳における皮質脊髄路線維の順行性トレーシング

PKC $\gamma$ 染色は皮質脊髄路以外のニューロンも染色されるため、皮質脊髄路の経路をより特異的に観察する目的で、ビオチン化デキストランアミン (biotinylated dextran amine, BDA) による順行性トレーシングを野生型 (n = 15) および DKO (n = 21) マウスで行った。BDA を片側の一次運動野に定位的に注入後、アビジン-ビオチンペルオキシダー

ゼ複合体 (avidin-biotin peroxidase complex, ABC) 法と 3,3'-ジアミノベンジジン

(diaminobenzidine, DAB) 反応を用いて BDA 陽性線維を検出し皮質脊髓路の経路を可視化した。野生型および DKO マウスの両方で、標識された線維は内包と大脳脚を伸長しながら、その側枝を線条体、視床、赤核、視蓋前野に投射していた (図 4A<sub>1</sub>-C<sub>1</sub>, 4A<sub>2</sub>-C<sub>2</sub>)。橋のレベルにおいて、野生型マウスの皮質脊髓路は脳の外側表面を内側に向かい (図 4D<sub>1</sub>)、橋核に側枝 (図 4E<sub>1</sub>, 白抜き矢印) を伸長しながら腹尾側方向に下行して延髄錐体路を形成する (図 4F<sub>1</sub>)。一方、解析した全ての DKO マウスで、異常な線維が中脳側面に見られ (図 4D<sub>2</sub>-F<sub>2</sub>)、橋の尾側では側方に扁平に広がった錐体路が認められた (図 4F<sub>2</sub>)。

野生型マウスの視蓋では、BDA 陽性の側枝が上丘に多く見られ (図 4F<sub>1</sub>)、連続切片の観察から、これらが視床を通過して上丘の外側領域に密な集積を形成し (図 4F<sub>1</sub>'-4F<sub>1</sub>'')、その後上丘の中間層内に向かって内側方向に伸長することが分かった (図 4F<sub>1</sub>')。DKO マウスにおいても BDA 陽性の側枝の分布は野生型マウスと類似していたが、その密度は野生型マウスよりも高かった (図 4F<sub>2</sub>, 4F<sub>2</sub>', 4F<sub>2</sub>'')。さらに、一部の DKO マウスでは中脳側面を伸長してきた線維が束のまま上丘深層を横断していく異常が観察された (n = 12/21, 図 4F<sub>2</sub>', 4F<sub>2</sub>'')。

延髄において、野生型マウスの皮質脊髓路線維は錐体交叉で背側に伸長しながら正中を交叉する (図 4H<sub>1</sub>, 4H<sub>1</sub>', 4I<sub>1</sub>)。また、後索核に側枝を伸長する (図 4H<sub>1</sub>, 矢印)。

DKO マウスでは標識された線維が内側（図 4G<sub>2</sub>, 白抜き矢じり）と外側（図 4G<sub>2</sub>, 黒抜き矢じり）の 2 つの束に分かれていた。内側の束を走行する線維のほとんどは錐体交叉で正中を交叉するが（図 4G<sub>2</sub>-I<sub>2</sub>, 白抜き矢じり）、外側の束は交叉せずに同側の腹外側部を伸長した（n = 21/21; 図 4G<sub>2</sub>-I<sub>2</sub>, 黒抜き矢じり）。一部の DKO マウスでは、内側の束を走行する軸索のうち、少数が正中に到達してから同側に戻り背側に向かうものや（n = 8/21; 図 4H<sub>2</sub>-I<sub>2</sub>, 青抜き矢じり）、同側の前索に入るものが見られた（n = 9/21; 図 4H<sub>2</sub>', 赤抜き矢じり）。このような走行を示す軸索は、DKO マウスに比べて少数ではあるが、野生型マウスでも低頻度に認められた（n = 2/15, data not shown）。

次に、BDA 標識線維の脳全体での三次元再構成を行った。野生型マウスでは、皮質脊髄路の線維は内包、大脳脚、延髄錐体路を下行し、錐体交叉で正中を交叉した後、対側の後索に入ることが明瞭に観察できた（図 5A-B）。また、皮質脊髄路本幹から分岐した側枝が線条体、視床、上丘、橋、後索核に確認できた（図 5A; Catsman-Berrevoets and Kuypers, 1981; O'Leary et al., 1990; Lévesque et al., 1996; Wang et al., 2018）。一方、DKO マウスにおいては、中脳側面を背側に伸長した後に橋に戻る異常な U 字型の迂回路が全例で観察された（n = 21/21; 図 5C, E, 矢印）。この結果より、C57BL/6 の遺伝的背景を有する DKO マウス胎児脳で見られたものと同様の異常が混合遺伝的背景のマウスでも起こり、それが成獣まで持続することが確認された。また錐体交叉では、切片の解析で観察された、内側に位置する交叉性線維（図 5D, 5F, 黒抜き矢じり）、より外側

の非交叉性線維 (n = 21/21; 図 5D, F, 白矢じり)、同側の後索に入る少数の線維 (n = 8/21; 図 5D, 青矢じり) が明瞭に観察できた。さらに、一部の DKO マウスでは大脳脚における脱線維束化も認められた (n = 9/21; 図 5E, 白矢じり)。以上の結果より、DKO マウスの表現型には個体差があるものの、大脳脚と錐体交叉の異常は全ての DKO マウスで見られることが明らかになった (表 1)。

#### 4.3. *Sulf1/2* DKO マウス皮質脊髄路線維の両側性投射

次に、*Sulf1/2* DKO マウスで観察された交叉線維と非交叉線維が脊髄をどのように下行するか、脊髄の到達レベルや投射部位が通常とは異なるかを解析することとした。正常であれば脳の一次運動野の前肢領域に起始する皮質脊髄路は頸髄灰白質に投射し介在ニューロンを介して前肢の運動を支配し、後肢領域に起始する線維は腰髄灰白質に投射し後肢の運動を支配する。そこで、BDA を運動野の異なる領域に注入することにより、それぞれの支配領域からの投射を解析した。

野生型マウスにおいて、一次運動野の前肢領域に BDA を定位的に注入すると (図 6A、代表的な定位座標, +1.2 AP, +1.5 ML, 0.7 DV, 単位 mm)、標識された線維が注入部位と対側の頸髄後索の腹内側部に認められた (図 6C)。標識された線維は腹外側に向かって対側の灰白質中間部に入り (図 6C)、その線維には終末様構造 (ブトン) が見

られた（図 6C'', 白抜き矢印）。一方、腰髄にシグナルはほとんど見られなかった（図 6D）。DKO マウスでは標識された線維が対側の後索に加えて同側の側索を下行していた（図 6G）。後索の線維が野生型マウスと同様に対側灰白質中間部に投射するのに対し（図 6G）、側索の線維は内側に向かって同側灰白質に投射した（図 6G', 矢じり）。さらに、正中を交叉する少数の線維が認められた（図 7）。また、側索および後索からの線維終末は両者ともブトン様構造を有していた（図 6G'', 矢印）。以上の結果から、野生型マウスの皮質脊髄路は投射が対側の脊髄にほぼ限局しているのに対し、DKO マウスは両側性投射を示すことが分かった。さらに、野生型マウスと同様に腰髄への投射はほとんど見られない（図 6H）。

次に、BDA を野生型マウスの後肢領域に注入すると（図 6B、代表的な定位座標, -1.2 AP, +1.0 ML, 0.7 DV）、標識された線維は頸髄の灰白質にはほとんど投射せずに後索を通過し（図 6E）、腰髄の対側灰白質背側部に投射した（図 6F）。DKO マウスでは、前肢領域の場合と同様に、標識された線維が対側後索および同側側索を下行していた（図 6I-J）。また、野生型マウスと同様に、頸髄にはほとんど投射が見られず（図 6I）、腰髄灰白質の背側部に両側性の投射を認めた（図 6J）。

さらに、野生型と DKO マウスの皮質脊髄路の投射を正確に比較するため、脊髄への BDA 標識線維の分布を定量的に解析した。標識の程度が個体によって異なるため、頸髄と腰髄にあるシグナルを計測してその合計を求め、各関心領域（region of interest,

ROI) のシグナルが占める割合をパーセンテージで算出した。このために画像解析ソフト ImageJ を用いて背景信号の閾値を決定し、閾値以上を示すシグナル強度の合計である integrated density の値を使用した。ROI を設定した白質もしくは灰白質内にある全ての線維に占める各 ROI 内の標識線維の割合を integrated density のパーセンテージで表した。言い換えると、白質もしくは灰白質内に設定した頸髄および腰髄の ROI 内の integrated density の合計に対する各 ROI の integrated density の割合を図に示した (方法の詳細に関しては「対象と方法」の項の「標識された神経線維の定量化」を参照のこと)。まず対側後索 (contralateral dorsal funiculus, cDF) を下行する正常な線維と同側側索 (ipsilateral lateral funiculus, iLF) を下行する異常な線維の割合 (%) を比較した (図 8A)。組織学的解析の結果と同様に、標識線維が野生型マウスでは対側後索に局限するのに対し、*Sulf1/2* DKO マウスでは対側後索だけでなく同側側索に分布することが示された (図 8B-C)。次に灰白質への投射を左右に分けて解析したところ、野生型マウスではほとんどの標識線維が対側灰白質に分布するのに対し、DKO マウスでは対側 (Contra) だけでなく同側 (Ipsi) にも分布することが定量的に確認できた (図 8D-E)。また、前肢領域 (図 8D) および後肢領域 (図 8E) に由来する標識線維が、それぞれ頸髄および腰髄灰白質にいずれも両側性に分布していた。最後に灰白質における標識線維の背腹方向の分布を比較した。そのために脊髄灰白質を背腹軸方向に四分割し、背側四半部、中間部、腹側四半部への分布を両側のシグナルを合算して比較した。前肢

領域からの線維は野生型では頸髄灰白質の中間部に主に分布し、DKO マウスも同様の分布を示した（図 8F）。後肢領域からは腰髄灰白質の背側部と中間部に主な投射を認め、DKO でも同様の分布であった（図 8G）。以上の組織学および定量的解析より、少なくとも今回 BDA を注入した 2 カ所の領域においては、どちらに起始する皮質脊髄路も対側後索と同側側索の両者を下行すること、DKO の皮質脊髄路はその経路が異常であるにも関わらず正しい脊髄レベルに終止することが示された。

#### 4.4. *Sulf1/2* DKO マウス皮質脊髄路の位置特異的な投射

皮質脊髄路が起始する領域は一次運動野だけでなく、感覚運動皮質の全域にわたる広い領域から起始する。前述した、DKO マウスの皮質脊髄路が 2 つの経路を下行しいずれも正しい脊髄レベルに終止するという特徴が、感覚運動皮質全体においても当てはまるのかを調べる目的で、感覚運動皮質全域に系統的に BDA を注入し（図 9）、それぞれの注入部位からの投射を調べた。対照群ではブレグマより前方の領域（図 9A<sub>2</sub>-A<sub>4</sub>, B<sub>2</sub>-B<sub>4</sub>）で主に頸髄への投射を認めた。DKO マウスでも同様の領域（図 9D<sub>2</sub>-D<sub>4</sub>, E<sub>2</sub>-E<sub>4</sub>）で頸髄への投射を認めた。DKO マウスでは、いずれの領域から伸長する軸索も対側後索と同側側索の両者を通過し灰白質の両側に投射していた。また、対照群と DKO マウスのどちらにおいても、より内側後方の領域で主に腰髄への投射を認めた（図 10B<sub>2</sub>-B<sub>3</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, E<sub>2</sub>-E<sub>3</sub>, F<sub>1</sub>-F<sub>3</sub>）。腰髄に投射する領域は頸髄に投射する領域よりも内側後方に位置

しており、これは電気刺激や光遺伝学的な刺激で解析された運動皮質のマッピングで、後肢支配領域が前肢支配領域の内側後方に位置することと一致している (Li and Waters, 1991; Ayling et al., 2009; Tennant et al., 2011)。対照群では BDA 陽性線維が対側に局限するのに対し、DKO マウスは両側性の投射となっている影響で脊髄内のシグナル密度が少なく見えている可能性はあるが、頸髄・腰髄に主に投射する領域の配置に関しては概ね同様の傾向であった。以上より DKO マウスの皮質脊髄路は一次運動野に起始するものだけでなく感覚運動皮質全域において、どの部位から起始するかによらず対側後索と同側側索の二つの経路をとること、またどの経路を通るかによらず本来到達する脊髄レベルに終止するということが示唆された。

#### 4.5. *Sulf1/2* DKO マウス一次運動野の電気刺激による両側性反応

ここまでの解析で、*Sulf1/2* DKO マウスでは皮質脊髄路線維が脊髄に両側性に投射することが明確に示された。そこで、DKO マウスの同側脊髄に投射する非交叉線維が運動ニューロンの活動を制御しているかを調べることにした。そのために一次運動野の皮質内微小電気刺激後の筋電図反応を記録した。麻酔したマウスを定位固定装置に固定し刺激電極を一次運動野に挿入した。一次運動野の片側を電気刺激すると野生型では対側の前肢の動きが誘発されたのに対し、DKO マウスでは同様の刺激で両側性の動きが誘発された。この前肢の動きと一致して、筋電図反応の記録においても、野生型マウスで

は4連矩形波の皮質内微小電気刺激により筋電図反応が対側の上腕二頭筋および三頭筋でのみ観察されたのに対し、DKOマウスでは反応が両側性に検出された(図11)。この結果から、DKOマウスの皮質脊髄路線維は同側と対側の運動ニューロン両者と機能的な連絡があり、それにより両側の運動ニューロンの活動が制御されていることが示唆された。

#### 4.6. *Sulf1/2* DKOマウスにおける微細運動の異常

通常観察では *Sulf1/2* DKOマウスに歩行の障害や失調、異常な動作は見られない。また、オープンフィールド試験で30分間の移動距離を計測したが野生型とDKOマウスで顕著な差は認められなかった(図12A)。ロタロッド試験において、5分かけて加速する回転軸上からマウスが落ちるまでの時間を計測したが、野生型とDKOマウスで有意な差は認められず、試行毎に徐々にとどまることのできる時間が長くなる傾向も同様であった(図12B)。以上より粗大運動に関しては野生型とDKOマウスの間に明らかな違いがないことが示唆された。さらにホットプレート試験では野生型とDKOマウスで痛みを伴う温度刺激を避けようとするのにかかる時間に有意な差はなく、DKOマウスの温痛覚が正常であることが示された(図12C)。

マウスでは運動皮質や延髄錐体路の損傷により、微細な運動に障害が出現することが分かっている (Baird et al., 2001; Starkey et al., 2005)。 *Sulfl/2* DKO マウスの皮質脊髄路は解剖学的異常に加え、その機能障害として微細な運動に障害が存在する可能性を考え、微細な運動の評価に用いられる 3 種類の行動試験を行うこととした (Brooks and Dunnet, 2009; Schönfeld et al., 2017)。まず初めに感覚運動機能および運動協調性を評価することのできるグリッドウォーキング試験を行った (Starkey et al., 2005)。この試験では、高く設置された格子状の網の上をマウスに 3 分間歩かせ、踏み外し (foot fault) を測定した。踏み外しの頻度 (foot fault [%]) は、前後肢ともに野生型マウスより *Sulfl/2* DKO マウスで高く、その差は後肢では有意であった (図 13B)。

次に、さらに微細な運動としてエサを掴んで食べる動作を解析する目的で、ステアケース試験 (Montoya et al., 1991; Baird et al., 2001) を行った。この試験では、中央の台座と左右の階段状ステップから成る狭く透明な回廊部分と白いスタート部分で構成される試験装置 (図 13C') を使用した。着脱式の階段状ステップは左右それぞれ 8 段あり、小さいペレットを各段にある浅く掘られたくぼみに置くことができるようになっている (図 13C)。この装置の中で、マウスは片側のペレットを同じ側の前肢で取る (図 13D, 矢印) ことができるので、それぞれの前肢によりペレットを取るマウスの能力を評価できる。両側の各段にペレットを 1 つずつ載せた装置内に、絶食させたマウスを入れ 30 分間自由にペレットをとらせる試験を 4 日間にわたって行った。各試験後に残っ

たペレットの数と場所を記録した。マウスが取って食べるのに成功したペレットの数  
“number of pellets collected” は、DKO マウスでは野生型マウスよりも低かった（図  
13E）。しかしながら、到達した最大距離 “maximum distance reached” を比較すると  
DKO マウスで野生型よりも浅いウェルまでしか前肢が届いていない傾向があったため  
（図 13F）、マウスの前肢が届いたステップ両側の合計で “number of pellets collected” を  
除して計算した成功率 “success rate” を算出して比較した。その結果、成功率も試験期  
間全体にわたって野生型マウスに比べて低くなったことから（図 13G）、DKO マウス  
の前肢運動機能の障害が示唆された。

最後に、同じ位置においてあるエサに対し正確に手を伸ばして掴む動作に焦点を当て  
た行動試験としてシングルペレットリーチング試験（Farr and Whishaw, 2002; Chen et al.,  
2014）を行った。この試験では、透明な四角い枠に開けられた狭いスリットを通して前  
肢でペレットを取るようマウスを訓練した（図 14A-B）。初めに絶食させたマウスに  
対して、20 分以内に 20 回以上のリーチ動作が見られるまで中央スリットからペレット  
を取るよう訓練した。マウスは両側の前肢を使用するが、より多く使用した前肢を利き  
肢とした。それに続く試験期間（1 日 1 試験を 8 日間）では、マウスが利き肢でペレ  
ットをとるように定位置の窪みにペレットを 1 つ置いた（図 14B）。マウスがペレットを  
掴んで口まで運べた成功率（success rate [%]）は野生型マウスよりも DKO マウスで低  
く（図 14C）、DKO マウスのペレットを掴む能力が低下していることが示された。野

野生型マウスでは試験期間中に成功率が上昇していったが、DKO マウスでは成功率は上昇しなかった（図 14C）。

次に成功したリーチにおいてマウスがどのようにペレットを掴む動作をしているのか、前肢の動きの軌道と速さについて運動学的計測を行った（Whishaw, 1996）。成功したリーチ動作を解析対象とし、マウス前肢の第二指先端（digit）、第二中手指節関節（metacarpophalangeal joint, MCP joint）、手関節（wrist）の位置を1フレーム毎にマークし、それぞれの軌道を解析した（図 14D）。手関節（wrist）の軌道長は同程度であったが、手指（digit）と MCP 関節の軌道は野生型マウスよりも DKO マウスで短くなっており（図 14E）、前肢遠位部の運動に異常があることが分かった。野生型と DKO マウスで手指の軌道が特にペレットを掴む付近で大きく違っていたため、次にペレットを掴む前後の手指の動きの速度分布を解析した。成功したリーチ動作の録画記録のうちペレットを掴む瞬間を含めた連続5フレームで手指先端の位置をマークし、2点間の速度を計測した（図 14F）。野生型マウスではペレット近くで手指のスピードが減速するのに対し、DKO マウスでは手指のスピードが逆に加速するという特徴が見出された（図 14G-K）。この解析により DKO マウスでは成功したリーチ動作においてさえ通常とは異なった形で目標に向かっての動作をしていることが明らかになった。

次に DKO マウスがリーチ動作においてどのような失敗をしているかに注目して解析を行った（図 15）。リーチ動作の success 以外の結果を、マウスがペレットを掴めなか

った場合は failure、掴んだもののスリットを通過する前に失った場合は loss、スリットを通過後に落とした場合は drop と分類したところ (図 15A)、野生型と比較して DKO マウスでは掴めなかった場合である failure の割合が多かった (図 15B)。個体毎に成績のばらつきがあるのは野生型と同様であり、特に成績の低い個体で特定の失敗が多くなるというような一定の傾向は見出されなかった (図 15C)。failure, loss, drop について試験期間中の変化も比較したが、明らかな経時的変化の違いはみられなかった (図 15D, E)。また、DKO マウスの個体による成績の違いと、利き肢側の後索を通過する線維もしくは側索を通過する線維の量とに相関関係があるかについて調べた。各個体の頸髄切片における利き肢側の後索もしくは側索の PKC $\gamma$  のシグナル (integrated density) が、success、drop、loss、failure rate と相関関係があるかを解析したが、いずれの値とも相関関係は認められなかった (data not shown)。また軌道長や速度との相関関係も認められなかった。

## 5. 考察

本研究では、混合遺伝的背景を有する *Sulfl/2* DKO マウスが成獣まで生存することを利用して、成獣脳における皮質脊髄路の解剖学的大よび機能的異常を明らかにした。まず、遺伝的背景が C57BL/6 の DKO マウス胎児脳と同様の中脳における軸索走行異常 (Okada et al., 2017) が混合遺伝的背景のマウスでも起こり、それが成獣まで持続することが分かった。さらに、先行研究では解析できなかった錐体交叉と脊髄への投射における異常を見出した。*Sulfl/2* DKO マウスの錐体交叉では、正中近くに位置する線維がほぼ正常に正中交叉するのに対し、外側寄りに位置する線維は交叉しなかった。脊髄では、正中交叉した線維が対側後索を下行して対側灰白質に入る一方で、交叉しなかった線維は同側の側索を下行し同側の灰白質に入り、皮質脊髄路が両側性に投射していることが示された。この解剖学的異常と一致して、DKO マウスでは一側の一次運動野ニューロンの電気刺激で両側前肢の筋電図反応が誘発された。さらに、運動機能を評価する行動試験において *Sulfl/2* DKO マウスの成績が不良であることを示し、前肢の微細な運動の障害があることを明らかにした。

### 5.1. 錐体交叉異常を引き起こすメカニズム

皮質脊髄路軸索が大腦脚を正常に走行するためには、Sulf1/2 が走行路近傍のヘパラン硫酸を脱硫酸化し、反発性軸索ガイダンス分子スリット 2 の分布を適切に調節する必要がある (Okada et al., 2017)。このことから、DKO マウスで錐体路が側方に扁平に広がる異常や錐体交叉における正中交叉異常の原因として、ヘパラン硫酸の脱硫酸化が起これなくなったことで、何らかの軸索ガイダンスシグナルが変化した可能性が考えられる。特に、錐体交叉における皮質脊髄路の軸索ガイダンスについては、セマフォリンやネトリン、細胞接着分子 NCAM および L1 のシグナルが重要であることが報告されている (Canty and Murphy, 2008; Leyva-Díaz and López-Bendito, 2013; Welniarz et al., 2017a)。

実際、セマフォリン 6A (*Sema6a*) とその受容体プレキシシン A3 (*Plxna3*) /プレキシシン A4 (*Plxna4*; Faulkner et al., 2008; Rünker et al., 2008)、ネトリン受容体 DCC (*Kanga mutant expressing a truncated DCC protein [Dcc<sup>kanga</sup>]*) および UNC5C (*rostral cerebellar malformation mutant, Unc5c<sup>rcm</sup>*; Finger et al., 2002)、NCAM (*Ncam1*; Rolf et al., 2002) および L1 (*L1cam*; Dahme et al., 1997; Cohen et al., 1998) の遺伝子変異によって様々な錐体交叉異常が引き起こされる。

*Sema6a*、*Plxna3*、*Plxna4* KO および *Plxna3/Plxna4* DKO マウスでは、延髄後方まで到達した線維のほとんどが徐々に正中から離れ、錐体交叉で正中を交叉せずに同側の腹外側部を下行する。一方、正中近くを走行する少数の線維は正常な交叉を示す (Faulkner et al., 2008; Rünker et al., 2008)。これは、延髄後方で皮質脊髄路を取り囲むように位置

する下オリブ核にセマフォリン 6A が発現し、正常であればその反発作用によって皮質脊髄路線維が正中付近を走行し続けることができるが、KO マウスではこの働きが無くなるために多くの線維が上記の錐体交叉異常を示したと考えられている。この交叉異常は *Sulf1/2* DKO マウスと類似しているように見えるが、*Sema6a* KO マウスでは皮質脊髄路線維が延髄表面で回旋性に伸長する異常など (Okada et al., 2019)、*Sulf1/2* DKO マウスでは見られない異常も複数存在している。

*Dcc<sup>kanga</sup>* 変異マウスでは、皮質脊髄路線維が錐体交叉の直前で内側と外側の束に分かれる (Finger et al., 2002; Welniarz et al., 2017b)。内側の束は前索を同側性に伸長し、外側の束は側索の腹側部を伸長することから (Finger et al., 2002)、*Dcc<sup>kanga</sup>* 変異マウスの皮質脊髄路異常は *Sulf1/2* DKO マウスとは異なると考えられる。*Unc5c<sup>rcm</sup>* 変異マウスでは、錐体交叉で皮質脊髄路線維が2つの束を形成し、一方の束は正中近くの正常な位置に、もう一方の束はより側方に位置する。前者の線維は正常に正中を交叉するが、その大部分は後索に入らず、後索のやや側方の灰白質を伸長し、後者は脊髄側索の最外部を同側性に下行する (Finger et al., 2002)。従って交叉線維の走行は *Sulf1/2* DKO マウスのそれとは異なっているが、非交叉線維は *Sulf1/2* DKO マウスに類似していると考えられる。

*L1cam* と *Ncam1* KO マウスでは、皮質脊髄路線維の大部分が正中を交叉せず、同側の後索に入る (Cohen et al., 1998; Rolf et al., 2002)。*Ncam1* KO マウスでは同側後索の線維

だけでなく、延髄で同側の腹外側面を伸長する線維も存在する (Rolf et al., 2002)。

*L1cam* KO マウスでは皮質脊髄路線維の数が減少し、頸髄より尾側ではほとんど観察されない (Dahme et al., 1997; Cohen et al., 1998)。従ってこれらの表現型は *Sulf1/2* DKO マウスのそれとは大きく異なっている。

以上の比較から、現在までに報告されている遺伝子変異マウスで *Sulf1/2* DKO マウスと全く同一の異常を示すものはいない。従って、*Sulf1/2* DKO マウスの錐体交叉異常は、上記の軸索ガイダンスシグナルのどれか1つだけが欠損もしくは減弱したために引き起こされた訳ではないと考えられることから、*Sulf1/2* DKO マウスの錐体交叉では複数の軸索ガイダンスシグナルが欠損あるいは減弱している可能性がある。また、大脳脚においてはスリット2のシグナルが増強していることから、*Sulf1/2* DKO マウスでは何らかの軸索ガイダンスシグナルが活性化されることにより錐体交叉異常が生じた可能性も考えられる。

これとは別のメカニズムとして、延髄錐体路と正中との距離が、線維の交叉に影響する可能性も考えられる。*Sulf1/2* DKO マウスでは、正中からおよそ 700  $\mu\text{m}$  以内の皮質脊髄路線維がほぼ正常に交叉したのに対し、この境界よりも外側の線維は交叉しなかったことから、正中交叉を制御する軸索ガイダンスシグナルはこの範囲内でのみ作用する可能性が考えられる。この観点でみると、錐体交叉異常は軸索ガイダンスシグナルの異常によって引き起こされたのではなく、中脳側面で異常に迂回した後に延髄のどの位置を

走行するかが、交叉・非交叉を既定する主たる原因かもしれない。また中枢神経系の長軸方向の神経路と正中との位置関係についてスリット-ロボのシグナルの重要性が示唆されている (Simpson et al., 2000; Rajagopalan et al., 2000; Farmer et al., 2008; Jaworski et al., 2010)。*Sulf1/2* DKO マウスの大脳脚ではスリット 2 のシグナルが増強していることより、皮質脊髄路が延髄でとる位置についてもスリット 2 の延髄でのシグナルの変化が影響している可能性も考えられる。

## 5.2. 脊髄側索を下行する皮質脊髄路線維

皮質脊髄路は進化的に哺乳類で出現した主要な下行性経路である。皮質脊髄路の解剖学的特徴は生物種間で類似しているが、その線維が脊髄で走行する位置は動物種によって異なっている (Lemon, 2008; Welniarz et al., 2017a)。げっ歯類では交叉した線維は後索の最腹側部に位置するが、交叉しなかった少数の線維は前索に存在する (Brösamle and Schwab, 1997)。走行する位置は異なるものの、交叉線維と非交叉線はどちらも同じ皮質の領域に起始する (Brösamle and Schwab, 1997)。一方、霊長類では交叉線維が側索を走行するのに対し、非交叉線維は前索と側索に位置する (Welniarz et al., 2017a)。*Sulf1/2* DKO マウスだけでなく *Dcc* および *Unc5c* 変異体においても、非交叉線維が側索を下行していることより、マウスの側索は皮質脊髄路軸索の通過を制限しているわけではないと考えられる。従って側索が種を超えて許容的な走行路であることが示

唆されることから、経路選択の種の違いに影響するメカニズムを調べていくことは興味深い (Gu et al., 2017)。さらに、*Sulf1/2* DKO マウスの皮質脊髄路線維がどの経路を伸長するかによらず本来の脊髄レベルに終止するという今回の発見から、脊髄の適切なレベルで皮質脊髄路軸索の伸長を止めるメカニズムの存在が示唆される。

### 5.3. 皮質脊髄路の脊髄への両側性投射

*Sulf1/2* DKO マウスの皮質脊髄路線維は錐体交叉で正中交叉が異常となった結果、両側性投射を示す。一方、エフリン B3 (*Efnb3*)、EphA4 (*Epha4*)、Eph の下流で機能する  $\alpha$  キメリン (*Chn1*) を欠損したマウスでは、錐体交叉で正中を正常に交叉し対側後索を下行するが、その後、脊髄灰白質内で正中を再交叉する線維が存在するために両側性の投射となる (Dottori et al., 1998; Kullander et al., 2001a, 2001b; Yokohama et al., 2001; Iwasato et al., 2007)。脊髄灰白質ではエフリン B3 が正中に発現しており、その反発作用によって皮質脊髄路の灰白質内での交叉を防いでいる。上記の変異マウスでは、エフリン B3 の正中線バリアが欠損した結果、脊髄の介在ニューロンの軸索が正中を異常に交叉することも示されている。興味深いことに、これらのマウスでは両肢を揃えて歩くホッピング歩行が見られ、これは歩行中に左右を交互に動かさないことにより引き起こされると考えられている (Kullander et al., 2003; Borgius et al., 2014; Serradj et al., 2014; Katori et al., 2017)。脊髄特異的に *Epha4* もしくは *Chn1* を欠損させたコンディショナル

KO マウスではホッピング歩行が見られるのに対し、同遺伝子を前脳特異的に破壊した場合は、脊髄灰白質内での正中再交叉が見られるものの歩行が正常であることから (Borgius et al., 2014; Katori et al., 2017)、ホッピング歩行は脊髄内の介在ニューロンの異常な正中交叉によって引き起こされることが示唆されている。*Sulf1/2* DKO マウスでは、通常の観察下で歩行に異常は認められないことから、脊髄内の歩行制御に関わる神経回路の形成や機能は正常であると考えられる。

興味深いことに、*Sulf1/2* DKO マウスに見られる解剖学および機能的な異常と類似した神経学的な病態が先天性鏡像運動症 (congenital mirror movement, CMM) の患者で観察されている。CMM は体の一側の意図した運動によって誘発される反対側の不随意運動を特徴とする稀な遺伝性疾患である (Galléa et al., 2011; Cox et al., 2012; Welniarz et al., 2017a)。遺伝的研究によって *DCC*、*RAD51*、*NTN1* (ネトリン 1) 遺伝子の変異が CMM を引き起こすことが明らかになってきた (Srour et al., 2010; Depienne et al., 2012; Méneret et al., 2017)。 *DCC* もしくは *NTN1* 遺伝子のヘテロ接合変異を持つ一部の CMM 患者では、錐体交叉で交叉しない皮質脊髄路線維の割合が増加し、一側の一次運動野の経頭蓋的磁気刺激で両手の筋反応が誘発された (Méneret et al., 2017; Welniarz et al., 2017b)。従って解剖学および電気生理学的な異常のパターンは *Sulf1/2* DKO マウスとほぼ同じであるが、ホームケージ内や今回の行動試験では *Sulf1/2* DKO マウスにホッピング歩行を含む左右前肢の異常な同期は見られなかった。しかしながら、前述の前脳

特異的な *EphA4* コンディショナル KO マウスは、通常ではホッピング歩行を呈さないが、障害物を乗り越える必要のある適応的歩行において左右の前肢の動きに異常な同期を呈することが報告されている (Serradj et al., 2014)。従って、同様の行動実験において *Sulfl/2* DKO マウスが左右前肢の同期した動きを示す可能性がある。また、*Sulfl/2* DKO マウスを用いて皮質脊髄路の正中交叉異常と鏡像運動との関連や左右の同期した運動制御を調べることは重要であると考えられる。

#### 5.4. 運動機能異常

皮質脊髄路は脊髄運動ニューロン活動の皮質制御に重要な役割を果たしており、その機能異常が運動の障害を引き起こすことが知られている (Lemon, 2008; Welniarz et al., 2017a)。げっ歯類においても、運動皮質の損傷、延髄錐体路の外科的切断、皮質脊髄路ニューロンの光遺伝学的抑制によって実験的に運動障害引き起こされる (Baird et al., 2001; Farr and Whishaw, 2002; Starkey et al., 2005; Ueno et al., 2018)。*Sulfl/2* DKO マウスは粗大な運動や歩行に顕著な異常は認められないが、ステアケース試験とシングルペレットリーチング試験では成績が不良であり、前肢の微細運動の障害が示唆された。*Sulfl/2* DKO マウスはシングルペレットリーチング試験における前肢遠位部の軌道と目標付近での速度制御が野生型と異なっており、*Sulfl/2* DKO マウスが通常とは異なった形で目標に向かっての動作をしていることが明らかになった。*Sulfl/2* DKO マウスの皮

質脊髄路の解剖学的な異常の程度には個体差があり、行動試験の成績にも個体差があるため、解剖学的異常の程度と機能障害の程度に相関がみられれば両者の因果関係をより直接的に結びつけられると考えられるが、シングルペレットリーチング試験の成績やその運動学的計測から得られたパラメーター（軌道長、速度）と皮質脊髄路の解剖学的異常（対側／同側および後索／側索の PKC $\gamma$  染色のシグナル強度）に相関関係は見出されなかった。

げっ歯類では、皮質脊髄路は運動、体性感覚、頭頂、帯状、視覚、前頭前領域から起始し、様々な脳機能に関与する（Lemon, 2008; Welniarz et al., 2017a）。それゆえに *Sulf1/2* DKO マウスの運動障害は、運動ニューロンの興奮だけでなく、脊髄反射の抑制および感度制御や求心性入力の下行性制御を含む皮質脊髄路機能の障害によって引き起こされるのかもしれない（Lemon, 2008; Welniarz et al., 2017a）。体性感覚皮質もしくはマウスの行動に影響する他の領野から起始する皮質脊髄路線維の障害（Lemon, 2008; Wang et al., 2017; Ueno et al., 2018）も考慮すべきであろう。さらに皮質脊髄路への感覚フィードバックが運動の制御に重要な役割を果たしていることに留意することも重要である（Seki et al., 2003; Bui et al., 2013; Bourane et al., 2015）。ホットプレート試験で評価した感覚機能は *Sulf1/2* DKO マウスで正常であったが、感覚皮質からの皮質脊髄路線維の投射の異常による感覚障害が行動試験の成績に影響した可能性は除外できない。

しかしながら、延髄錐体路が両側切断されたラットでリーチング課題が行われた以前の研究では、損傷群のラットはペレットまで前肢を伸ばす動作自体には問題がないが手指で的確にペレットを掴む動作に支障があり成功率が低下したと指摘されている

(Castro, 1972)。また正常では前肢がペレットに接近する際に速度を減速することが示されているが (Whishaw, 1996)、片側の延髄錐体路を切断した場合にはペレット直近の異常な手指の加速がみられている (Whishaw et al., 1993)。Sulfl/2 DKO マウスでも前肢遠位部の運動に異常があり、ペレットを掴む前後で加速する特徴が見られたことから、皮質脊髄路形成異常と微細運動障害との関連が示唆される。Sulfl/2 DKO マウスの運動障害のメカニズムをさらに理解するために、運動障害が正常に交叉した線維の数の減少によって起こるのか、それとも異常な同側性の線維が交叉線維の正常な機能を干渉することによって起こるのかを解明することも、今後の重要な検討課題である。

## 6. 謝辞

本研究に関して多くのご支援と御指導を賜り、基礎医学研究の機会を与えてくださった、本学 医学医療系神経内科学分野 玉岡晃教授に深く感謝致します。また、本研究全てにわたり終始数多くの御指導、御助言を賜りました分子神経生物学研究室 榎正幸教授に篤く感謝致します。日々の研究において適切な御助言、御指導をくださいました榎和子先生、岡田拓也先生、塩見健輔先生に心より感謝致します。共同研究者として皮質内微小電気刺激および筋電図記録に携わってくださった神経生理学研究室 小金澤禎史先生、Tri Huu Doan さんに心より感謝の意を表します。ロタロッドおよびオープンフィールド試験の実施および解析に関して御助言、御協力を賜りました環境生物学研究室 秋山雅博先生に篤く感謝の意を表します。行動実験装置の設計と作製に際して御助言と御協力をくださった医学工作室の小林浩三様に深謝致します。巧緻運動の解析方法について御指導と御助言をくださった産業技術総合研究所 人間情報研究部門 肥後範行先生に深く感謝致します。学会発表時に御意見を賜り論文執筆時にも重要な御助言をくださいました富山大学 西丸広史先生、帝京大学 亀田浩司先生、福田諭先生、村部直之先生に御礼申し上げます。最後になりますが、これまで共に研究に取り組み、支えてくださった研究室の皆様へ感謝いたします。ありがとうございました。

## 7. 出典

本学位論文では *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 12(333), 2020

([doi.org/10.3389/fnmol.2019.00333](https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00333)) に掲載された論文の内容を、Frontiers 社の規定にした

がって再利用している。

## 8. 参考文献

- Ai, X, Do, AT, Lozynska, O, Kusche-Gullberg, M, Lindahl, U, and Emerson, CP,Jr. QSulf1 remodels the 6-O sulfation states of cell surface heparan sulfate proteoglycans to promote Wnt signaling. *J.Cell Biol.* (2003) **162**:341-51.
- Ayling, OG, Harrison, TC, Boyd, JD, Goroshkov, A, and Murphy, TH. Automated light-based mapping of motor cortex by photoactivation of channelrhodopsin-2 transgenic mice. *Nat.Methods* (2009) **6**:219-24.
- Baird, AL, Meldrum, A, and Dunnett, SB. The staircase test of skilled reaching in mice. *Brain Res.Bull.* (2001) **54**:243-50.
- Bagri, A, Marin, O, Plump, AS, Mak, J, Pleasure, SJ, Rubenstein, JL, et al. Slit proteins prevent midline crossing and determine the dorsoventral position of major axonal pathways in the mammalian forebrain. *Neuron* (2002) **33**:233-48.
- Bishop, JR, Schuksz, M, and Esko, JD. Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology. *Nature* (2007) **446**:1030-7.
- Borgius, L, Nishimaru, H, Caldeira, V, Kunugise, Y, Low, P, Reig, R, et al. Spinal glutamatergic neurons defined by EphA4 signaling are essential components of normal locomotor circuits. *J.Neurosci.* (2014) **34**:3841-53.

Bourane, S, Grossmann, KS, Britz, O, Dalet, A, Del Barrio, MG, Stam, FJ, et al. Identification of a spinal circuit for light touch and fine motor control. *Cell* (2015) **160**:503-15.

Brooks, SP and Dunnett, SB. Tests to assess motor phenotype in mice: a user's guide. *Nat.Rev.Neurosci.* (2009) **10**:519-29.

Brösamle, C and Schwab, ME. Cells of origin, course, and termination patterns of the ventral, uncrossed component of the mature rat corticospinal tract. *J.Comp.Neurol.* (1997) **386**:293-303.

Bui, TV, Akay, T, Loubani, O, Hnasko, TS, Jessell, TM, and Brownstone, RM. Circuits for grasping: spinal dI3 interneurons mediate cutaneous control of motor behavior. *Neuron* (2013) **78**:191-204.

Canty, AJ and Murphy, M. Molecular mechanisms of axon guidance in the developing corticospinal tract. *Prog.Neurobiol.* (2008) **85**:214-35.

Castro, AJ. Motor performance in rats. The effects of pyramidal tract section. *Brain Res.* (1972) **44**:313-23.

Catsman-Berrevoets, CE and Kuypers, HGJM. A search for corticospinal collaterals to thalamus and mesencephalon by means of multiple retrograde fluorescent tracers in cat and rat. *Brain Res.* (1981) **218**:15-33.

Chen, CC, Gilmore, A, and Zuo, Y. Study motor skill learning by single-pellet reaching tasks in mice. *J.Vis.Exp.* (2014) **(85)**. doi:10.3791/51238.

Cohen, NR, Taylor, JS, Scott, LB, Guillery, RW, Soriano, P, and Furley, AJ. Errors in corticospinal axon guidance in mice lacking the neural cell adhesion molecule L1. *Curr.Biol.* (1998) **8**:26-33.

Cox, BC, Cincotta, M, and Espay, AJ. Mirror movements in movement disorders: a review. *Tremor Other Hyperkinet Mov.(N.Y)* (2012) **2**:10.7916/D8VQ31DZ. Epub 2012 Apr 16.

Dahme, M, Bartsch, U, Martini, R, Anliker, B, Schachner, M, and Mantei, N. Disruption of the mouse L1 gene leads to malformations of the nervous system. *Nat.Genet.* (1997) **17**:346-9.

Depienne, C, Bouteiller, D, Meneret, A, Billot, S, Groppa, S, Klebe, S, et al. RAD51 haploinsufficiency causes congenital mirror movements in humans. *Am.J.Hum.Genet.* (2012) **90**:301-7.

Ding, YQ, Xiang, CX, and Chen, ZF. Generation and characterization of the PKC gamma-Cre mouse line. *Genesis* (2005) **43**:28-33.

Dottori, M, Hartley, L, Galea, M, Paxinos, G, Polizzotto, M, Kilpatrick, T, et al. EphA4 (Sek1) receptor tyrosine kinase is required for the development of the corticospinal tract. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* (1998) **95**:13248-53.

El Masri, R, Seffouh, A, Lortat-Jacob, H, and Vives, RR. The "in and out" of glucosamine 6-O-sulfation: the 6th sense of heparan sulfate. *Glycoconj.J.* (2017) **34**:285-98.

Farmer, WT, Altick, AL, Nural, HF, Dugan, JP, Kidd, T, Charron, F, et al. Pioneer longitudinal axons navigate using floor plate and Slit/Robo signals. *Development* (2008) **135**:3643-53.

Farr, TD and Whishaw, IQ. Quantitative and qualitative impairments in skilled reaching in the mouse (*Mus musculus*) after a focal motor cortex stroke. *Stroke* (2002) **33**:1869-75.

Faulkner, RL, Low, LK, Liu, XB, Coble, J, Jones, EG, and Cheng, HJ. Dorsal turning of motor corticospinal axons at the pyramidal decussation requires plexin signaling. *Neural Dev.* (2008) **3**:21,8104-3-21.

Finci, LI, Kruger, N, Sun, X, Zhang, J, Chegkazi, M, Wu, Y, et al. The crystal structure of netrin-1 in complex with DCC reveals the bifunctionality of netrin-1 as a guidance cue. *Neuron* (2014) **83**:839-49.

Finger, JH, Bronson, RT, Harris, B, Johnson, K, Przyborski, SA, and Ackerman, SL. The netrin 1 receptors Unc5h3 and Dcc are necessary at multiple choice points for the guidance of corticospinal tract axons. *J.Neurosci.* (2002) **22**:10346-56.

Fransen, E, D'Hooge, R, Van Camp, G, Verhoye, M, Sijbers, J, Reyniers, E, et al. L1 knockout mice show dilated ventricles, vermis hypoplasia and impaired exploration patterns.

*Hum.Mol.Genet.* (1998) **7**:999-1009.

Galléa, C, Popa, T, Billot, S, Meneret, A, Depienne, C, and Roze, E. Congenital mirror movements: a clue to understanding bimanual motor control. *J.Neurol.* (2011) **258**:1911-9.

Gu, Z, Kalambogias, J, Yoshioka, S, Han, W, Li, Z, Kawasaki, YI, et al. Control of species-dependent cortico-motoneuronal connections underlying manual dexterity. *Science* (2017) **357**:400-4.

Iwasato, T, Katoh, H, Nishimaru, H, Ishikawa, Y, Inoue, H, Saito, YM, et al. Rac-GAP alpha-chimerin regulates motor-circuit formation as a key mediator of EphrinB3/EphA4 forward signaling. *Cell* (2007) **130**:742-53.

Jakeman, LB, Chen, Y, Lucin, KM, and McTigue, DM. Mice lacking L1 cell adhesion molecule have deficits in locomotion and exhibit enhanced corticospinal tract sprouting following mild contusion injury to the spinal cord. *Eur.J.Neurosci.* (2006) **23**:1997-2011.

Jaworski, A, Long, H, and Tessier-Lavigne, M. Collaborative and specialized functions of Robo1 and Robo2 in spinal commissural axon guidance. *J.Neurosci.* (2010) **30**:9445-53.

Joshi, PS, Molyneaux, BJ, Feng, L, Xie, X, Macklis, JD, and Gan, L. Bhlhb5 regulates the postmitotic acquisition of area identities in layers II-V of the developing neocortex. *Neuron* (2008) **60**:258-72.

Katori, S, Noguchi-Katori, Y, Itohara, S, and Iwasato, T. Spinal RacGAP alpha-Chimaerin Is Required to Establish the Midline Barrier for Proper Corticospinal Axon Guidance. *J.Neurosci.* (2017) **37**:7682-99.

Kullander, K, Butt, SJ, Lebret, JM, Lundfald, L, Restrepo, CE, Rydstrom, A, et al. Role of EphA4 and EphrinB3 in local neuronal circuits that control walking. *Science* (2003) **299**:1889-92.

Kullander, K, Croll, SD, Zimmer, M, Pan, L, McClain, J, Hughes, V, et al. Ephrin-B3 is the midline barrier that prevents corticospinal tract axons from recrossing, allowing for unilateral motor control. *Genes Dev.* (2001a) **15**:877-88.

Kullander, K, Mather, NK, Diella, F, Dottori, M, Boyd, AW, and Klein, R. Kinase-dependent and kinase-independent functions of EphA4 receptors in major axon tract formation in vivo. *Neuron* (2001b) **29**:73-84.

Lamanna, WC, Kalus, I, Padva, M, Baldwin, RJ, Merry, CL, and Dierks, T. The heparanome--the enigma of encoding and decoding heparan sulfate sulfation. *J.Biotechnol.* (2007) **129**:290-307.

- Lee, JS and Chien, CB. When sugars guide axons: insights from heparan sulphate proteoglycan mutants. *Nat.Rev.Genet.* (2004) **5**:923-35.
- Lemon, RN. Descending pathways in motor control. *Annu.Rev.Neurosci.* (2008) **31**:195-218.
- Lévesque, M, Charara, A, Gagnon, S, Parent, A, and Deschênes, M. Corticostriatal projections from layer V cells in rat are collaterals of long-range corticofugal axons. *Brain Res.* (1996) **709**:311-5.
- Leyva-Díaz, E and López-Bendito, G. In and out from the cortex: development of major forebrain connections. *Neuroscience* (2013) **254**:26-44.
- Li, CX and Waters, RS. Organization of the mouse motor cortex studied by retrograde tracing and intracortical microstimulation (ICMS) mapping. *Can.J.Neurol.Sci.* (1991) **18**:28-38.
- Liu, Y, Shi, J, Lu, CC, Wang, ZB, Lyuksyutova, AI, Song, XJ, et al. Ryk-mediated Wnt repulsion regulates posterior-directed growth of corticospinal tract. *Nat.Neurosci.* (2005) **8**:1151-9.
- Masu, M. Heparan sulfate regulates axon guidance. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* (2008) **53**:489-94.
- Masu, M. Proteoglycans and axon guidance: a new relationship between old partners. *J.Neurochem.* (2016) **139 Suppl 2**:58-75.

Meijering, E, Dzyubachyk, O, and Smal, I. Methods for cell and particle tracking. *Methods Enzymol.* (2012) **504**:183-200.

Méneret, A, Franz, EA, Trouillard, O, Oliver, TC, Zagar, Y, Robertson, SP, et al. Mutations in the netrin-1 gene cause congenital mirror movements. *J.Clin.Invest.* (2017) **127**:3923-36.

Montoya, CP, Campbell-Hope, LJ, Pemberton, KD, and Dunnett, SB. The "staircase test": a measure of independent forelimb reaching and grasping abilities in rats. *J.Neurosci.Methods* (1991) **36**:219-28.

Mori, M, Kose, A, Tsujino, T, and Tanaka, C. Immunocytochemical localization of protein kinase C subspecies in the rat spinal cord: light and electron microscopic study. *J.Comp.Neurol.* (1990) **299**:167-77.

Nagamine, S, Tamba, M, Ishimine, H, Araki, K, Shiomi, K, Okada, T, et al. Organ-specific sulfation patterns of heparan sulfate generated by extracellular sulfatases Sulf1 and Sulf2 in mice. *J.Biol.Chem.* (2012) **287**:9579-90.

O'Callaghan, JP and Holtzman, SG. Quantification of the analgesic activity of narcotic antagonists by a modified hot-plate procedure. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* (1975) **192**:497-505.

Okada, T, Keino-Masu, K, Nagamine, S, Kametani, F, Ohto, T, Hasegawa, M, et al. Desulfation of Heparan Sulfate by Sulf1 and Sulf2 Is Required for Corticospinal Tract Formation.

*Sci.Rep.* (2017) **7**:13847,017-14185-3.

Okada, T, Keino-Masu, K, Suto, F, Mitchell, KJ, and Masu, M. Remarkable complexity and variability of corticospinal tract defects in adult Semaphorin 6A knockout mice. *Brain Res.*

(2019) **1710**:209-19.

O'Leary, DD, Bicknese, AR, De Carlos, JA, Heffner, CD, Koester, SE, Kutka, LJ, et al. Target selection by cortical axons: alternative mechanisms to establish axonal connections in the

developing brain. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.* (1990) **55**:453-68.

Perrimon, N and Bernfield, M. Specificities of heparan sulphate proteoglycans in developmental processes. *Nature* (2000) **404**:725-8.

Pratt, T, Conway, CD, Tian, NM, Price, DJ, and Mason, JO. Heparan sulphation patterns generated by specific heparan sulfotransferase enzymes direct distinct aspects of retinal axon

guidance at the optic chiasm. *J.Neurosci.* (2006) **26**:6911-23.

Rajagopalan, S, Vivancos, V, Nicolas, E, and Dickson, BJ. Selecting a longitudinal pathway:

Robo receptors specify the lateral position of axons in the *Drosophila* CNS. *Cell* (2000)

**103**:1033-45.

- Rolf, B, Bastmeyer, M, Schachner, M, and Bartsch, U. Pathfinding errors of corticospinal axons in neural cell adhesion molecule-deficient mice. *J.Neurosci.* (2002) **22**:8357-62.
- Rünker, AE, Little, GE, Suto, F, Fujisawa, H, and Mitchell, KJ. Semaphorin-6A controls guidance of corticospinal tract axons at multiple choice points. *Neural Dev.* (2008) **3**:34,8104-3-34.
- Schönfeld, LM, Dooley, D, Jahanshahi, A, Temel, Y, and Hendrix, S. Evaluating rodent motor functions: Which tests to choose?. *Neurosci.Biobehav.Rev.* (2017) **83**:298-312.
- Seffouh, A, Milz, F, Przybylski, C, Laguri, C, Oosterhof, A, Bourcier, S, et al. HSulf sulfatases catalyze processive and oriented 6-O-desulfation of heparan sulfate that differentially regulates fibroblast growth factor activity. *FASEB J.* (2013) **27**:2431-9.
- Seki, K, Perlmutter, SI, and Fetzi, EE. Sensory input to primate spinal cord is presynaptically inhibited during voluntary movement. *Nat.Neurosci.* (2003) **6**:1309-16.
- Serradj, N, Paixao, S, Sobocki, T, Feinberg, M, Klein, R, Kullander, K, et al. EphA4-mediated ipsilateral corticospinal tract misprojections are necessary for bilateral voluntary movements but not bilateral stereotypic locomotion. *J.Neurosci.* (2014) **34**:5211-21.
- Simpson, JH, Bland, KS, Fetter, RD, and Goodman, CS. Short-range and long-range guidance by Slit and its Robo receptors: a combinatorial code of Robo receptors controls lateral position. *Cell* (2000) **103**:1019-32.

Srour, M, Riviere, JB, Pham, JM, Dube, MP, Girard, S, Morin, S, et al. Mutations in DCC cause congenital mirror movements. *Science* (2010) **328**:592.

Starkey, ML, Barritt, AW, Yip, PK, Davies, M, Hamers, FP, McMahon, SB, et al. Assessing behavioural function following a pyramidotomy lesion of the corticospinal tract in adult mice. *Exp.Neurol.* (2005) **195**:524-39.

Steward, O, Zheng, B, Ho, C, Anderson, K, and Tessier-Lavigne, M. The dorsolateral corticospinal tract in mice: an alternative route for corticospinal input to caudal segments following dorsal column lesions. *J.Comp.Neurol.* (2004) **472**:463-77.

Tennant, KA, Adkins, DL, Donlan, NA, Asay, AL, Thomas, N, Kleim, JA, et al. The organization of the forelimb representation of the C57BL/6 mouse motor cortex as defined by intracortical microstimulation and cytoarchitecture. *Cereb.Cortex* (2011) **21**:865-76.

Tessier-Lavigne, M and Goodman, CS. The molecular biology of axon guidance. *Science* (1996) **274**:1123-33.

Ueno, M, Nakamura, Y, Li, J, Gu, Z, Niehaus, J, Maezawa, M, et al. Corticospinal Circuits from the Sensory and Motor Cortices Differentially Regulate Skilled Movements through Distinct Spinal Interneurons. *Cell.Rep.* (2018) **23**:1286,1300.e7.

Wang, S, Ai, X, Freeman, SD, Pownall, ME, Lu, Q, Kessler, DS, et al. QSulf1, a heparan sulfate 6-O-endosulfatase, inhibits fibroblast growth factor signaling in mesoderm induction and angiogenesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* (2004) **101**:4833-8.

Wang, X, Liu, Y, Li, X, Zhang, Z, Yang, H, Zhang, Y, et al. Deconstruction of Corticospinal Circuits for Goal-Directed Motor Skills. *Cell* (2017) **171**:440,455.e14.

Wang, Z, Maunze, B, Wang, Y, Tsoulfas, P, and Blackmore, MG. Global Connectivity and Function of Descending Spinal Input Revealed by 3D Microscopy and Retrograde Transduction. *J.Neurosci.* (2018) **38**:10566-81.

Welniarz, Q, Dusart, I, and Roze, E. The corticospinal tract: Evolution, development, and human disorders. *Dev.Neurobiol.* (2017a) **77**:810-29.

Welniarz, Q, Morel, MP, Pourchet, O, Gallea, C, Lamy, JC, Cincotta, M, et al. Non cell-autonomous role of DCC in the guidance of the corticospinal tract at the midline. *Sci.Rep.* (2017b) **7**:410,017-00514-z.

Whishaw, IQ, Pellis, SM, Gorny, B, Kolb, B, and Tetzlaff, W. Proximal and distal impairments in rat forelimb use in reaching follow unilateral pyramidal tract lesions. *Behav.Brain Res.* (1993) **56**:59-76.

Whishaw, IQ. An endpoint, descriptive, and kinematic comparison of skilled reaching in mice (Mus musculus) with rats (Rattus norvegicus). *Behav.Brain Res.* (1996) **78**:101-11.

Yokoyama, N, Romero, MI, Cowan, CA, Galvan, P, Helmbacher, F, Charnay, P, et al. Forward signaling mediated by ephrin-B3 prevents contralateral corticospinal axons from recrossing the spinal cord midline. *Neuron* (2001) **29**:85-97.

Yu, TW and Bargmann, CI. Dynamic regulation of axon guidance. *Nat.Neurosci.* (2001) **4** **Suppl**:1169-76.

Zack, GW, Rogers, WE, and Latt, SA. Automatic measurement of sister chromatid exchange frequency. *J.Histochem.Cytochem.* (1977) **25**:741-53.

## 9. 図の説明

### 図1 成獣脳の PKC $\gamma$ 染色像

(A-F) 野生型 (A<sub>1</sub>-F<sub>1</sub>) および *Sulf1/2* DKO (A<sub>2</sub>-F<sub>2</sub>) の脳における、大脳脚を経て橋までの冠状断切片像を示す。上段の模式図において冠状断 (A) から (F) の位置を図示する。野生型マウスでは皮質脊髄路線維は大脳脚 (cp, cerebral peduncle) から橋に向かって伸長した後、延髄で錐体路を形成する (A<sub>1</sub>-F<sub>1</sub>, 白抜き矢じり)。DKO マウスでは中脳腹側までの走行はほぼ正常だが (A<sub>2</sub>-C<sub>2</sub>)、中脳表面を異常に背側に伸長した線維が見られ (D<sub>2</sub>-F<sub>2</sub>, 黒矢じり)、腹側を下行する線維が野生型よりも側方に扁平に広がった状態となった (F<sub>2</sub>, 角括弧)。DKO マウスでは少数の線維が視床内部を異常に通過して中脳に投射した (B<sub>2</sub>'-E<sub>2</sub>', それぞれ B<sub>2</sub>-E<sub>2</sub> の枠で囲った部分の拡大像を示す; 黒矢じり)。Aq, aqueduct (中脳水道)、Cb, cerebellum (小脳)、Cx, cerebral cortex (大脳皮質)、f, fornix (脳弓)、Hi, hippocampus (海馬)、MGN, medial geniculate nucleus (内側膝状体)、MN, mammillary nucleus (乳頭核)、MO, medulla oblongata (延髄)、OB, olfactory bulb (嗅球)、PGN, pontine gray nucleus (橋核)、SC, superior colliculus (上丘)、SN, substantia nigra (黒質)、SpCd, spinal cord (脊髄)。スケールバーは 1.0 mm (A<sub>1</sub>-F<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>-F<sub>2</sub>)、500  $\mu$ m (B<sub>2</sub>'-E<sub>2</sub>') を示す。

## 図2 PKC $\gamma$ 染色像とその三次元再構成

(A-E) 野生型 (A<sub>1</sub>-E<sub>1</sub>) および *Sulf1/2* DKO (A<sub>2</sub>-E<sub>2</sub>) の脳における、延髄から脊髓前方までの冠状断切片像を示す。上段の模式図において冠状断 (A) から (E) の位置を図示する。野生型マウスでは延髄錐体路 (pyramidal tract, py) を下行した線維が、錐体交叉 (pyramidal decussation, pyx) で正中を交叉し、大部分の線維が対側の後索 (dorsal funiculus, df) に入る (A<sub>1</sub>-E<sub>1</sub>, 白抜き矢じり)。少数の線維は背外側皮質脊髓路として後索よりも外側を下行する (dorsolateral corticospinal tract, dlct; A<sub>1</sub>-E<sub>1</sub>, F-H)。DKO マウスでは、延髄錐体路が側方に扁平に広がり (A<sub>2</sub>-B<sub>2</sub>, 角括弧)、正中近くの線維が正中を交叉する一方で (C<sub>2</sub>-E<sub>2</sub>, 白抜き矢じり)、外側に位置する線維は同側を伸長した (C<sub>2</sub>-E<sub>2</sub>, 角括弧)。(F-H, J-L) PKC $\gamma$  陽性線維の三次元再構成。側方 (F, J)、前方 (G, K)、腹側 (H, L) からみた三次元像をそれぞれ示す。野生型マウスでは線維が正中近くを下行してから錐体交叉で対側の後索に入る (F-H)。DKO マウスでは延髄錐体路が内側と外側の束の2つに分かれ (L)、内側の束 (白括弧、K-L) は対側の後索に入る一方で、外側の束 (黄括弧、J-L) は脊髓同側の腹外側表面に伸長した。図 (F-H, J-L) 内の黄の点線は正中線を、白の点線は脳の輪郭をそれぞれ示す。前後 (anterior-posterior, A-P) および背腹 (dorsal-ventral, D-V) の体軸を示す。(I) および (M) は腹側からみた皮質脊髓路線維と正中線 (点線) を図示している。スケールバーは 600  $\mu$ m (A-E) と 1.0 mm (F-H, J-L) を示す。

### 図3 *Sulfl/2* DKO マウスの錐体交叉異常の多様性

(A-F) *Sulfl/2* DKO マウス 2 匹の錐体交叉の三次元再構成像。側方 (A, D)、前方 (B, E)、腹側 (C, F) からみた像を示す。DKO マウスの錐体交叉での異常の程度は個体によって差があり、交叉線維と非交叉線維の割合は左右でも違いがあることが分かる。白の点線は脳の外形、黄の点線は正中線をそれぞれ示す。内側の束を白括弧で、外側の束を黄括弧でそれぞれ示してある。前後 (anterior-posterior, A-P) および背腹 (dorsal-ventral, D-V) の体軸を示す。スケールバーは 1.0 mm を示す。図 2F-H と 2J-L を参照のこと。

### 図4 皮質脊髄路線維の BDA トレーシング

(A-I) BDA を注入した野生型 (A<sub>1</sub>-I<sub>1</sub>) と *Sulfl/2* DKO (A<sub>2</sub>-I<sub>2</sub>) の脳の冠状断切片像を示す。上段の模式図において冠状断 (A) から (I) の脳における部位を図示する。白抜き矢じりは正常な、黒矢じりは異常な皮質脊髄路の線維をそれぞれ示している。白抜き矢印は側枝を示す。点線は正中線を示す。(F<sub>1</sub>', F<sub>2</sub>')、(F<sub>1</sub>'', F<sub>2</sub>'')、(H<sub>1</sub>', H<sub>2</sub>') はそれぞれ (F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>)、(F<sub>1</sub>'', F<sub>2</sub>'')、(H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>) の枠で囲った部分の拡大像を示している。

(A<sub>1</sub>) および (A<sub>2</sub>) は運動皮質の注入部位を示している。標識された皮質脊髄路の線維は、野生型と *Sulfl/2* DKO の脳のいずれでも内包 (internal capsule, ic) と大脳脚

(cerebral peduncle, cp) を通過しながら、その側枝を視蓋前野 (pretectum, Pt)、赤核 (red nucleus, RN) に投射した ( $\mathbf{B}_1, \mathbf{B}_2, \mathbf{C}_1, \mathbf{C}_2$ )。野生型マウスでは橋核 (pontine gray nucleus, PGN) に側枝を出しながら腹尾側に下行し延髄錐体路 (pyramidal tract, py) を形成する ( $\mathbf{D}_1\text{--}\mathbf{F}_1$ )。DKO マウスでは異常な線維を中脳表面に認めた ( $\mathbf{D}_2\text{--}\mathbf{F}_2$ )。野生型マウスの視蓋では上丘に投射する側枝の集積が見られた ( $\mathbf{F}_1, \mathbf{F}_1', \mathbf{F}_1''$ )。DKO マウスでは側枝は同様の分布でより密度が高く、中脳側面を伸長してきた線維が東のまま上丘を横断する異常が見られた ( $\mathbf{F}_2, \mathbf{F}_2', \mathbf{F}_2''$ )。野生型マウスの錐体交叉では線維が背側にしながら正中を交叉する ( $\mathbf{G}_1\text{--}\mathbf{I}_1$ )。DKO マウスでは、線維の一部が錐体交叉 (pyramidal decussation, pyx) に到達する一方で、残りは外側にそれと同側性に腹外側部を下行した ( $\mathbf{G}_2\text{--}\mathbf{I}_2$ , 黒矢じり)。正中に達した線維のうち多くは正中を交叉し対側の後索に入った ( $\mathbf{G}_2, \mathbf{H}_2', \mathbf{I}_2$ ; 白抜き矢じり)。少数の線維は背側に向きを変えたものの正中を交叉せずに同側の後索に入った ( $\mathbf{H}_2', \mathbf{I}_2$ ; 青矢じり)。他の少数の異常な線維は同側の前索を下行した ( $\mathbf{H}_2'$ , 赤矢じり)。DCN, dorsal column nuclei (後索核)、IC, inferior colliculus (下丘)、SC, superior colliculu (上丘)、Str, striatum (線条体)、Th, thalamus (視床)。スケールバーは 1.0 mm ( $\mathbf{A}_1\text{--}\mathbf{C}_1, \mathbf{A}_2\text{--}\mathbf{C}_2$ )、850  $\mu\text{m}$  ( $\mathbf{D}_1\text{--}\mathbf{F}_1, \mathbf{D}_2\text{--}\mathbf{F}_2$ )、300  $\mu\text{m}$  ( $\mathbf{F}_1', \mathbf{H}_1', \mathbf{F}_2', \mathbf{H}_2'$ )、500  $\mu\text{m}$  ( $\mathbf{G}_1\text{--}\mathbf{I}_1, \mathbf{G}_2\text{--}\mathbf{I}_2$ )、100  $\mu\text{m}$  ( $\mathbf{F}_1'', \mathbf{F}_2''$ ) を示す。

図5 BDA で標識した皮質脊髄路の三次元像

(A-F) 野生型 (A, B) と 2 匹の *Sulf1/2* DKO (C-F) マウスからの代表三次元像を示す。DKO マウス #1 (C-D) は図 4 で示したのと同じ個体である。外側からみた脳の全体像 (A, C, E) と、腹側からみた延髄 (B, D, F) を提示している。黄の点線は正中線を、白の点線は脳の輪郭をそれぞれ示す。アスタリスク (\*) は BDA 注入部位を示す。野生型マウスでは、皮質脊髄路の全体像が運動皮質から対側の後索 (dorsal funiculus, df; 黒抜き矢じり) まで明瞭に観察された (A-B)。DKO マウスでは中脳表面を背側に伸長した後に後に戻る異常な迂回路が観察された (C, E; 矢印)。*Sulf1/2* DKO マウス #2 の大脳脚では皮質脊髄路線維に脱線維束化を認めた (E; 白矢じり)。錐体交叉 (pyramidal decussation, pyx) では、内側に位置する交叉性線維 (D, F; 黒抜き矢じり)、外側の非交叉性線維 (D, F; 白矢じり)、同側の後索に入る少数の線維 (D, 青矢じり) が明瞭に観察された。前後 (anterior-posterior, A-P)、背腹 (dorsal-ventral, D-V)、左右 (right-left, R-L) の体軸を図に示す。DCN, dorsal column nuclei (後索核)、ic, internal capsule (内包)、IC, inferior colliculus (下丘)、Pn, pons (橋)、py, pyramidal tract (錐体路)、SC, superior colliculus (上丘)、Str, striatum (線条体)、Th, thalamus (視床)。スケールバーは 1.0 mm (A, C, E) と 600  $\mu$ m (B, D, F) を示す。

図 6 BDA で標識された皮質脊髄路線維の脊髄内への投射

(A-B) 前肢および後肢領域の BDA 注入部位。赤の点線は前肢領域、青の点線は後肢領域をそれぞれ取り囲んでいる。代表的な注入部位（赤点および青点）の定位座標をそれぞれの右に示す。(C-J) 頸髄および腰髄における野生型 (C-F) と *Sulfl/2* DKO マウス (G-J) の横断切片像。点線は後索 (dorsal funiculus, DF) と同側の側索 (lateral funiculus, LF) の境界を示す。実線は正中線を示す。(C'), (C''), (F'), (F''), (G'), (G''), (J'), (J'') はそれぞれ (C), (C'), (F), (F'), (G), (G'), (J), (J') の枠で囲んだ領域の拡大像を示す。前肢領域に BDA を注入すると、野生型マウスでは、標識された線維が対側の頸髄後索から対側灰白質の中間部に投射し (C)、ブトン様構造を伴う終末分枝を形成した (C'', 白抜き矢印) が、腰髄にほとんどシグナルは見られなかった (D)。後肢領域に注入すると、野生型マウスでは標識された線維は頸髄灰白質にはほとんど投射せずに後索を通過し (E)、腰髄の対側灰白質背側部に投射した (F)。DKO マウスで前肢領域に BDA を注入すると、線維が対側後索と同側側索を下行し、後索の線維が対側灰白質中間部に投射し側索の線維は同側灰白質に投射し (G)、対側 (白抜き矢印) と同側 (黒矢印) の双方で終末分枝はブトン様構造を呈した (G'')。後肢領域に注入した場合も対側後索と同側側索を下行し、腰髄灰白質の背側部に両側性の投射を認めた (I, J)。(G') および (J') の矢じりは同側の側索から灰白質に入る線維を示す。スケールバーは 200  $\mu\text{m}$  (C-J)、35  $\mu\text{m}$  (C', F', G', J'), 20  $\mu\text{m}$  (C'', F'', G'', J'') を示す。

## 図7 *Sulf1/2* DKO の脊髄における皮質脊髄路線維の正中交叉

(A-C) *Sulf1/2* DKO マウスの頸髄の横断切片像。運動皮質（定位座標は [A] では+1.2 AP, +2.0 ML, 0.7 DV、 [B-C] では±0 AP, +1.5 ML, +0.7 DV, 単位 mm）に定位的に BDA を注入し皮質脊髄路の線維を標識した。*Sulf1/2* DKO マウスで一部の皮質脊髄路線維が異常に正中を交叉していた (A'-C'; 矢じり)。(A-C) の点線は後索と同側側索の境界をそれぞれ示す。(A-C) の実線および (A'-C') の点線は正中線をそれぞれ示す。

(A'-C') は (A-C) の枠で囲んだ領域の拡大像を示す。cc, central canal (中心管)。スケールバーは 500 μm (A-C) と 100 μm (A'-C') を示す。

## 図8 BDA で標識された皮質脊髄路線維の脊髄内分布の定量化

(A) BDA で標識された線維を定量化する際の関心領域 (regions of interest, ROIs)。対側後索 (contralateral dorsal funiculus, cDF) と同側側索 (ipsilateral lateral funiculus, iLF) の ROI は灰色の線で、対側 (contralateral, Contra) と同側 (ipsilateral, Ipsi) の灰白質は橙の線で、背側 (dorsal, D)、中間 (intermediate, Int)、腹側 (ventral, V) の灰白質は緑の線でそれぞれ外形を示す。前肢領域に BDA を注入した野生型および *Sulf1/2* DKO マウスの頸髄の代表画像 (図 6C および 6G に同じ) を示す。スケールバーは 200 μm を示す。(B-G) 各 ROI で閾値以上のシグナル強度の合計である integrated density を計測

し、頸髄と腰髄の ROI 全ての integrated density の合計に対する各 ROI の占める割合をパーセンテージで表示した。野生型 (n=6) および DKO マウス (n=6) において、前肢 (B, D, F) もしくは後肢領域 (C, E, G) に注入した際の BDA シグナル強度の integrated density の割合 (%) をグラフに表示した。前肢領域への BDA 注入で白質を通過する標識線維の割合を比較すると、野生型マウスでは対側後索に限局するのに対し、DKO マウスでは対側後索と同側側索の両者を通過している (B)。これは後肢領域への注入でも同様の傾向である (C)。灰白質への投射を左右に分けて比較すると、野生型マウスではほとんどの標識線維が対側灰白質に分布するのに対し、DKO マウスでは両側の脊髄灰白質に分布している (D, E)。両側の integrated density を合算して背腹軸方向の分布を解析すると、前肢領域からの線維は野生型・DKO マウスともに頸髄灰白質の中間部に主に分布し (F)、後肢領域からの線維は野生型・DKO マウスともに腰髄灰白質の背側部と中間部に主に分布した (G)。グラフは平均値 ± 標準誤差を示す。統計的有意差は二元配置分散分析とボンフェローニ法による事後検定を用いて算出した (\*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001)。

#### 図 9 BDA 注入部位と標識された皮質脊髄路線維の頸髄への分布との関連性

(A-F) 上段 (内外軸: ML) と左端 (前後軸: AP) の枠内に示した部位に BDA を注入した対照群 (A-C) と *Sulf1/2* DKO マウス (D-F) における代表的な頸髄横断切片

像。野生型マウス (**A<sub>3</sub>, A<sub>5</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>4</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>4</sub>**) に加えて、単独 *Sulf1* 欠損 (**A<sub>2</sub>, A<sub>4</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>5</sub>, C<sub>5</sub>**) および *Sulf2* 欠損 (**A<sub>1</sub>, C<sub>1</sub>, C<sub>3</sub>**) マウスを対照群として使用した (単独欠損マウスに皮質脊髄路の異常を認めなかったため)。BDA 注入部位を図の上部に白丸で図示した。定位座標は前後軸方向に +1.2, ±0, -1.2 mm、内外軸方向に 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 および 3.0 mm、背腹軸方向は 0.7 mm にそれぞれ設定している。対照群ではブレグマより前方の領域 (**A<sub>2</sub>-A<sub>4</sub>, B<sub>2</sub>-B<sub>4</sub>**) で主に頸髄への投射を認め、DKO マウスでも同様の領域 (**D<sub>2</sub>-D<sub>4</sub>, E<sub>2</sub>-E<sub>4</sub>**) で頸髄への投射を認めたが、いずれも軸索は対側後索と同側側索の両者を通過し灰白質への投射は両側性であった。スケールバーは 500 μm を示す。

#### 図 10 BDA 注入部位と標識された皮質脊髄路線維の腰髄への分布との関連性

(**A-F**) 上段 (内外軸: ML) と左端 (前後軸: AP) の枠内に示した部位に BDA を注入した対照群 (**A-C**) と *Sulf1/2* DKO マウス (**D-F**) における代表的な腰髄横断切片像。使用したマウスは図 9 で示したものと同一である。対照群ではブレグマより後方で内側の領域 (**B<sub>2</sub>-B<sub>3</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>**) で主に腰髄への投射を認め、DKO マウスでも同様の領域 (**E<sub>2</sub>-E<sub>3</sub>, F<sub>1</sub>-F<sub>3</sub>**) で腰髄への投射を認めたが、いずれも軸索は対側後索と同側側索の両者を通過し灰白質への投射は両側性であった。スケールバーは 500 μm を示す。

## 図 11 前肢筋の運動誘発電位

(A-B) 野生型 (A) および DKO マウス (B) における上腕二頭筋 (biceps) および三頭筋 (triceps) の筋電図反応の代表例。4 連の矩形波 (持続時間 200  $\mu$ s、刺激間隔 3 ms、50–100  $\mu$ A) の電流刺激を 550 ms 毎に右もしくは左の一次運動野に与え、上腕二頭筋および三頭筋の筋電図反応を記録した。500 回分の筋電図記録を整流し加算平均した。野生型マウスでは一側の一次運動野刺激で対側の筋のみ運動電位が誘発されたのに対し、*Sulfl/2* DKO マウスでは同じ刺激で両側の反応が誘発された。星印 (★) は刺激によるアーチファクトを示す。

## 図 12 オープンフィールド、ロタロッドおよびホットプレート試験

(A) オープンフィールド試験。角型フィールド (500  $\times$  500 mm, 壁高 400 mm) 内の 30 分間での移動距離を示す。野生型と *Sulfl/2* DKO マウスの間で有意差は認めなかった (それぞれ  $n=5$ 、 $P=0.245$ )。 (B) ロタロッド試験。5 分間かけて加速する (4~40 rpm) 回転軸上にマウスがとどまることのできた時間の長さを示す。野生型と *Sulfl/2* DKO マウスとの間に有意差は認められなかった (それぞれ  $n=5$ 、 $P=0.111$ )。 (C) ホットプレート試験。肢をなめる、擦り合わせる、もしくはジャンプするまでの潜時 (latency [s]) を示す。野生型と *Sulfl/2* DKO マウスの間で有意差は認められなかった

(それぞれ  $n=5$ 、 $14.0 \pm 1.4$  vs  $11.5 \pm 3.1$ ;  $P=0.54$ )。数値は平均値  $\pm$  標準誤差を示す。

統計的有意差は (A-B) では二元配置の反復測定分散分析とボンフェローニ法による事後検定を、(C) ではマン・ホイットニーの U 検定を用いて算出した。

### 図 13 グリッドウォーキングおよびステアケース試験

(A-B) グリッドウォーキング試験。格子状の網の上を自由に歩かせ四肢のいずれかが網の面より下方に落ちたとき (A, 矢印) に、踏み外し (foot fault) と判定する。(B) 前肢で 200 歩中、後肢で 50 歩中にそれぞれ何回の踏み外しがあるかを解析した。踏み外しの割合 (foot fault [%]) は野生型マウスよりも *Sulf1/2* DKO マウスで高くなった。前肢では有意な差でなかった ( $18.6 \pm 1.6$  vs.  $14.8 \pm 0.4$ ;  $P=0.065$ , マン・ホイットニーの U 検定) が、後肢では有意な差であった ( $3.7 \pm 0.6$  vs.  $1.0 \pm 0.4$ ;  $n=6$ ;  $*P<0.05$ )。

(C-G) ステアケース試験。(C) 左右階段状のステップが試験装置から取り外された状態。両側の下 7 段の窪みにそれぞれ 1 つずつペレットが載せてある。(C') ステアケース試験装置。左右階段状ステップが台座と壁面の隙間に挿入されている。絶食させたマウスを白いスタート部分 (写真左) に入れ、中央の台座 (写真右) に乗ってペレットを取らせる試験を 30 分間行った。(D) マウスの行動の録画記録。マウスがペレットに手を伸ばし、掴み、口に入れるのに成功している (矢印)。ペレットをとるのに失敗すると、ペレットは別のステップの窪みに移動するか、手の届かない床部分に入る (矢

じり)。(E-G) ステアケース試験の結果。試験を4日間にわたって行い、「獲得したペレット数 (number of pellets collected)」は野生型マウス (n=6) よりも *Sulf1/2* DKO マウス (n=6) で低くなった (E)。「到達した最大距離 (maximum distance reached)」はマウスが到達した最も深い段を示すが、DKO マウスで野生型よりも浅いウェルまでしか前肢が届いていない傾向があったため (F)、前肢が届いたステップ両側の合計で獲得したペレット数を除して計算した「成功率 (success rate)」算出し、成功率も試験期間全体にわたって DKO マウスで低くなった (G)。解析の詳細については「対象と方法」の項を参照のこと。数値は平均値 ± 標準誤差を示す。統計的有意差は二元配置の反復測定分散分析とボンフェローニ法による事後検定を用いて算出した (E-G; \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001)。

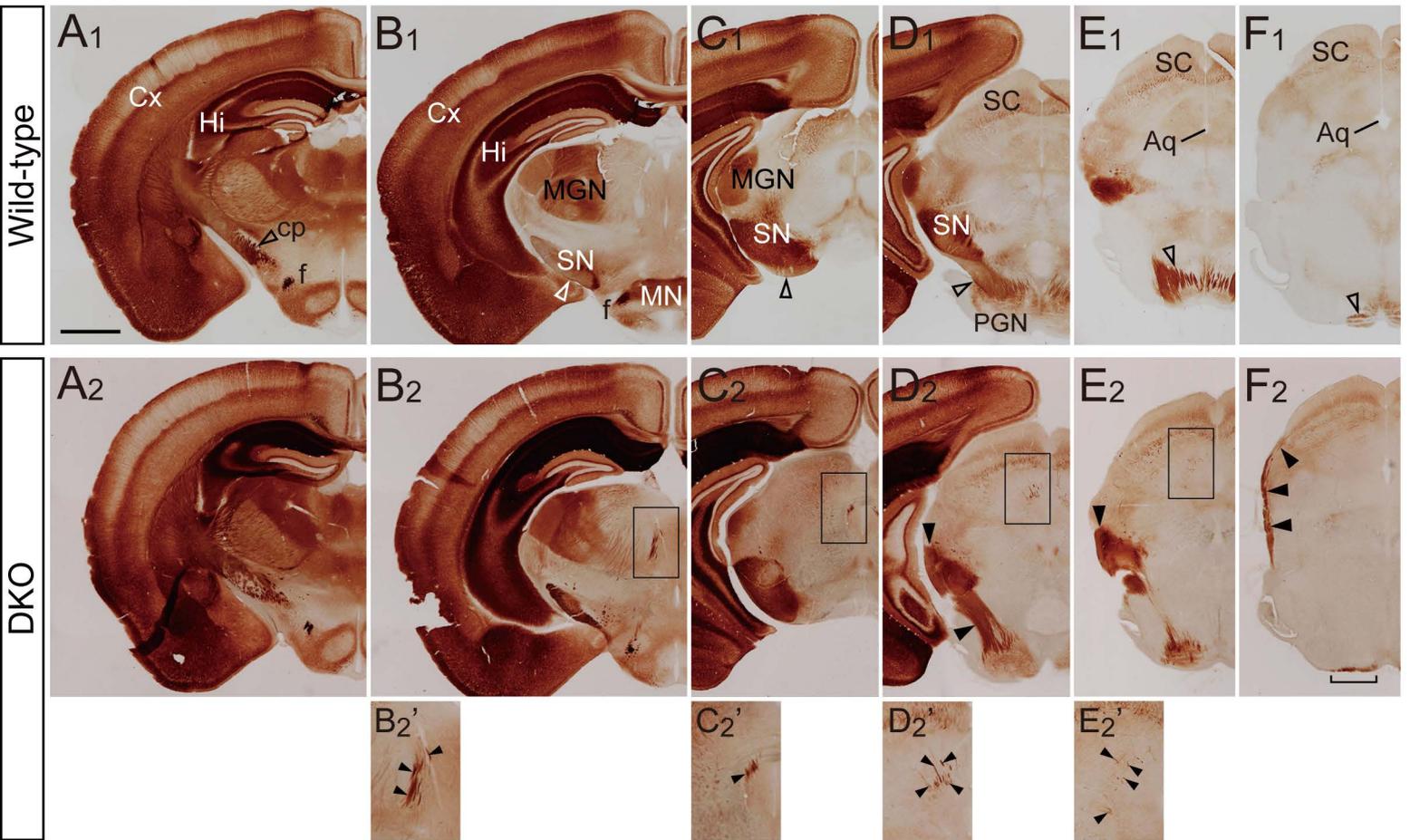
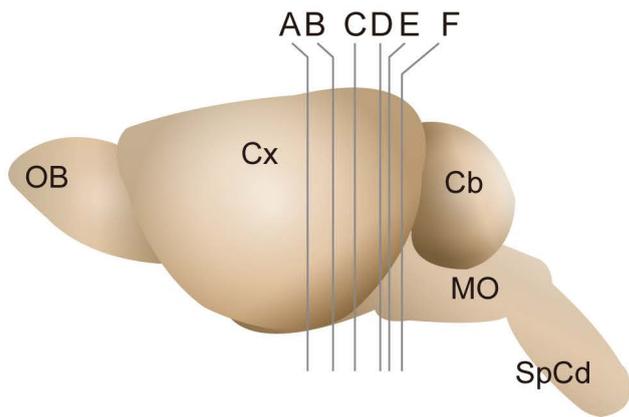
#### 図 14 シングルペレットリーチング試験

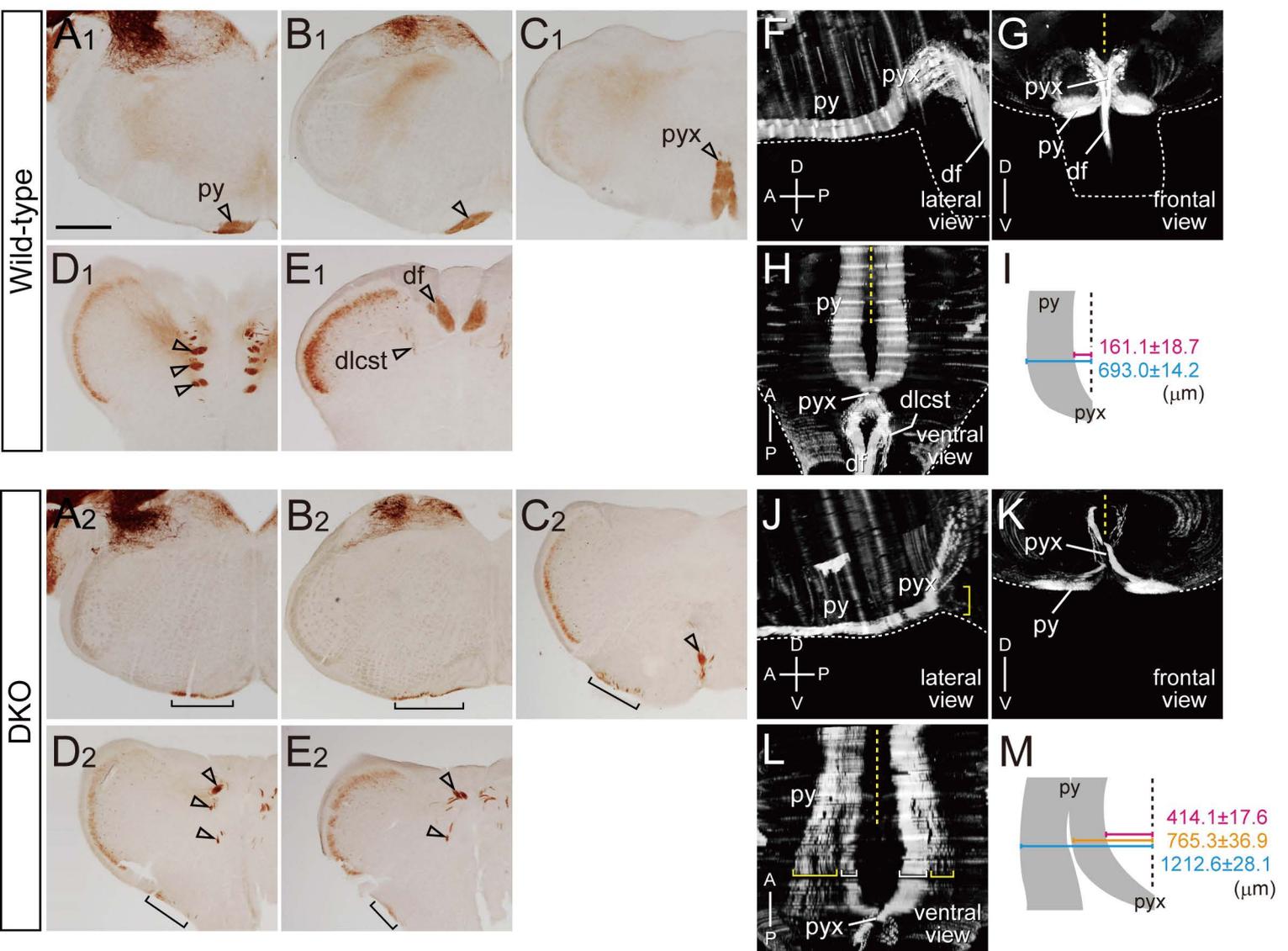
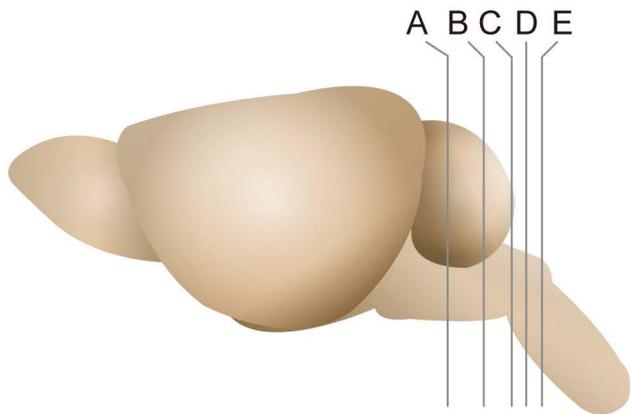
(A) シンプルペレットリーチング試験装置。(B) 成功した手を伸ばす動作 (リーチ動作)。スリットを通してマウスは前肢を伸ばし、窪みに置かれたペレットを掴み口に入れる (矢印)。(C) 8日間のリーチ成功率。野生型マウス (n=8) は経時的に成功率が上昇した [F(7, 49) = 3.19, P = 0.0072] が、*Sulf1/2* DKO マウス (n=10) は試験期間全体にわたって低い成功率であった [F(7, 63) = 0.749, P = 0.63]。結果的に DKO マウスの成功率は野生型マウスよりも試験3日目以降に低くなった。(D-E) 成功したリーチ

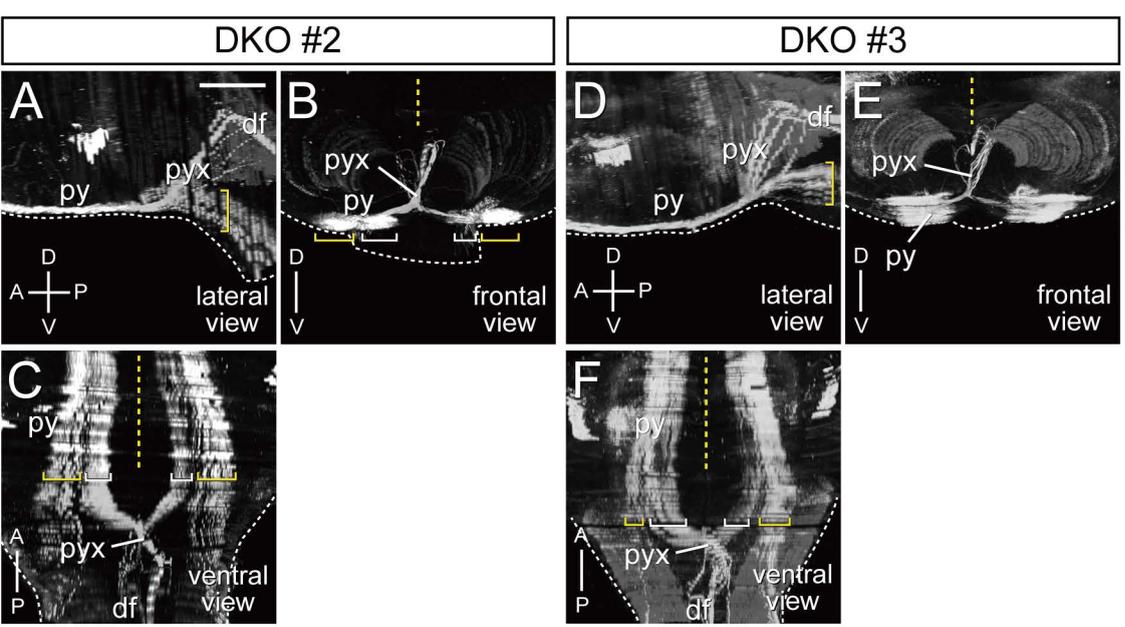
動作における前肢の軌道解析。第二指先端、第二中手指節 (metacarpophalangeal, MCP) 関節、手関節 (wrist) の位置を録画記録上でマーク (D, 青点) し、リーチ動作の軌道を解析した。野生型と *Sulf1/2* DKO マウスの軌道の代表例 (青線) を示す。点線はスリットの位置を示す。手関節の軌道の長さ (trajectory length) は同程度であったが、手指 (digit) と MCP 関節の軌道は野生型マウス (n=8) よりも *Sulf1/2* DKO マウス (n=9) で短くなった (E)。(F-K) 成功したリーチ動作における前肢の速度解析。成功したリーチ動作の録画記録のうちペレットを掴む瞬間のフレームとその前後2フレームずつを含めた連続5フレームで、第二指先端の位置 (P<sub>1</sub>~P<sub>5</sub>) をマークし、2点間の速度 (v<sub>1</sub>~v<sub>4</sub>) を計測した (F)。野生型マウスでは、v<sub>2</sub>およびv<sub>3</sub>はv<sub>1</sub>およびv<sub>4</sub>よりそれぞれ小さくなった (G, I-K)。それとは対照的に *Sulf1/2* DKO マウスではv<sub>2</sub>およびv<sub>3</sub>はv<sub>1</sub>およびv<sub>4</sub>よりそれぞれ大きくなった (H-K)。つまり野生型マウスではペレット近くで手指のスピードが減速するのに対し、DKO マウスでは手指のスピードが逆に加速した (G, H)。統計的有意差は (C, E) では一元配置および二元配置の反復測定分散分析とボンフェローニ法による事後検定を、(I-K) ではマン・ホイットニーのU検定を用いて算出した。\*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001。数値は平均値 ± 標準誤差を示す。

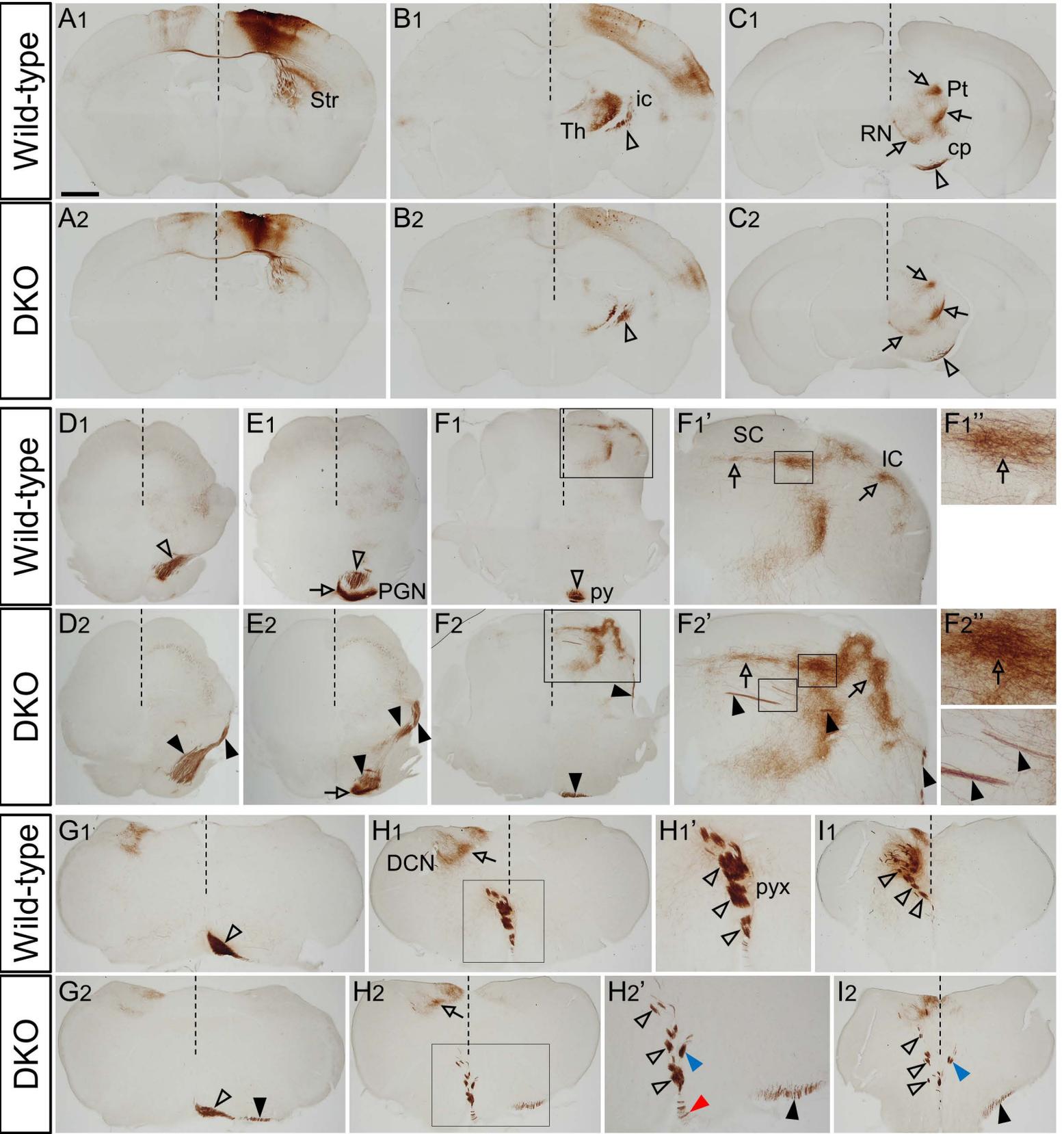
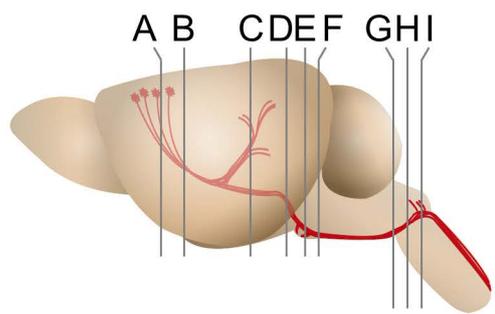
図 15 シングルペレットリーチング試験での *Sulf1/2* DKO マウスのリーチ動作の障害

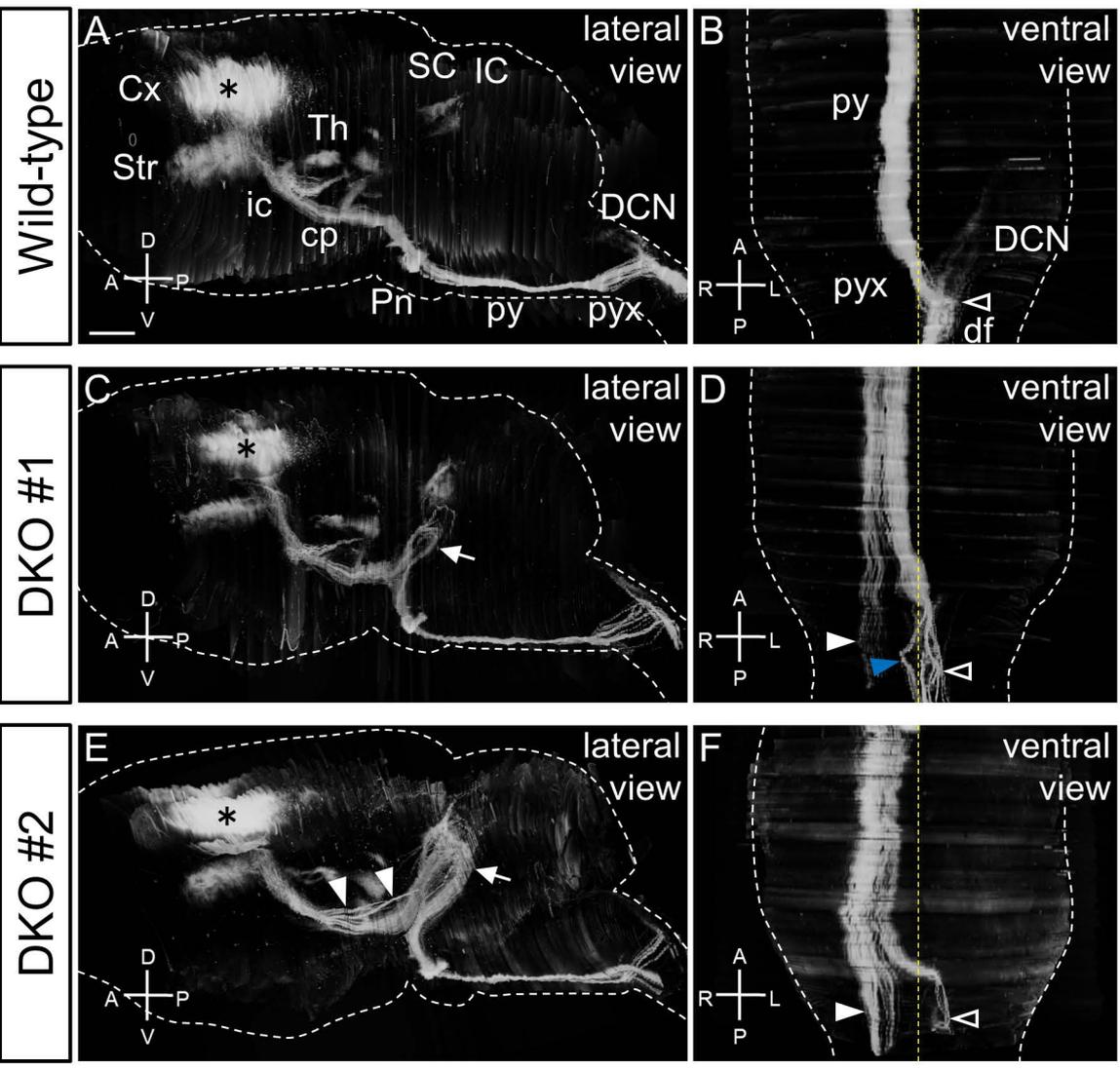
(A) 成績評価基準。シングルペレットリーチング試験におけるリーチ動作の結果を決定木に従って4種類 (failure, loss, drop, success) に分類した。マウスがペレットを掴めなかった場合は failure、掴んだものの前肢がスリットを通過する前にペレットを失った場合は loss、ペレットを掴んだまま前肢がスリットを通過できたものの口に入れる前に落とした場合は drop”、ペレットを首尾よく口まで入れた場合は success とした。(B) 野生型 (n = 8) および *Sulf1/2* DKO (n = 10) マウスの総リーチ数に対する failure, loss, drop, success の割合。野生型と比較して DKO マウスでは掴めなかった場合である failure の割合が多かった。数値は平均値 ± 標準誤差を示す。統計的有意差は二元配置分散分析とボンフェローニ法による事後検定を用いて算出した (\*\*\*) $P < 0.001$ )。 (C) 各マウスの8日間の failure, loss, drop, success の平均の割合。野生型もしくは *Sulf1/2* DKO マウス各群内での成功率で昇順に各マウスを並べた。個体毎の成績のばらつきは野生型マウスと DKO マウスの両者でみられ、特に成績の低い個体で特定の失敗が多くなるというような一定の傾向はなかった。(D-E) 野生型 (D) および *Sulf1/2* DKO マウス (E) における試験第1日から第8日までの failure, loss, drop, success の平均の割合。野生型マウスでは成功率が日数を増すに連れ増加した [ $F(7, 9) = 3.19, P = 0.0072$ ] が、*Sulf1/2* DKO マウスでは増加しなかった [ $F(7, 63) = 0.749, P = 0.63$ ]。failure, loss, drop については明らかな経時的変化の違いはみられなかった。統計的有意性は一元配置の反復測定分散分析を用いて算出した。

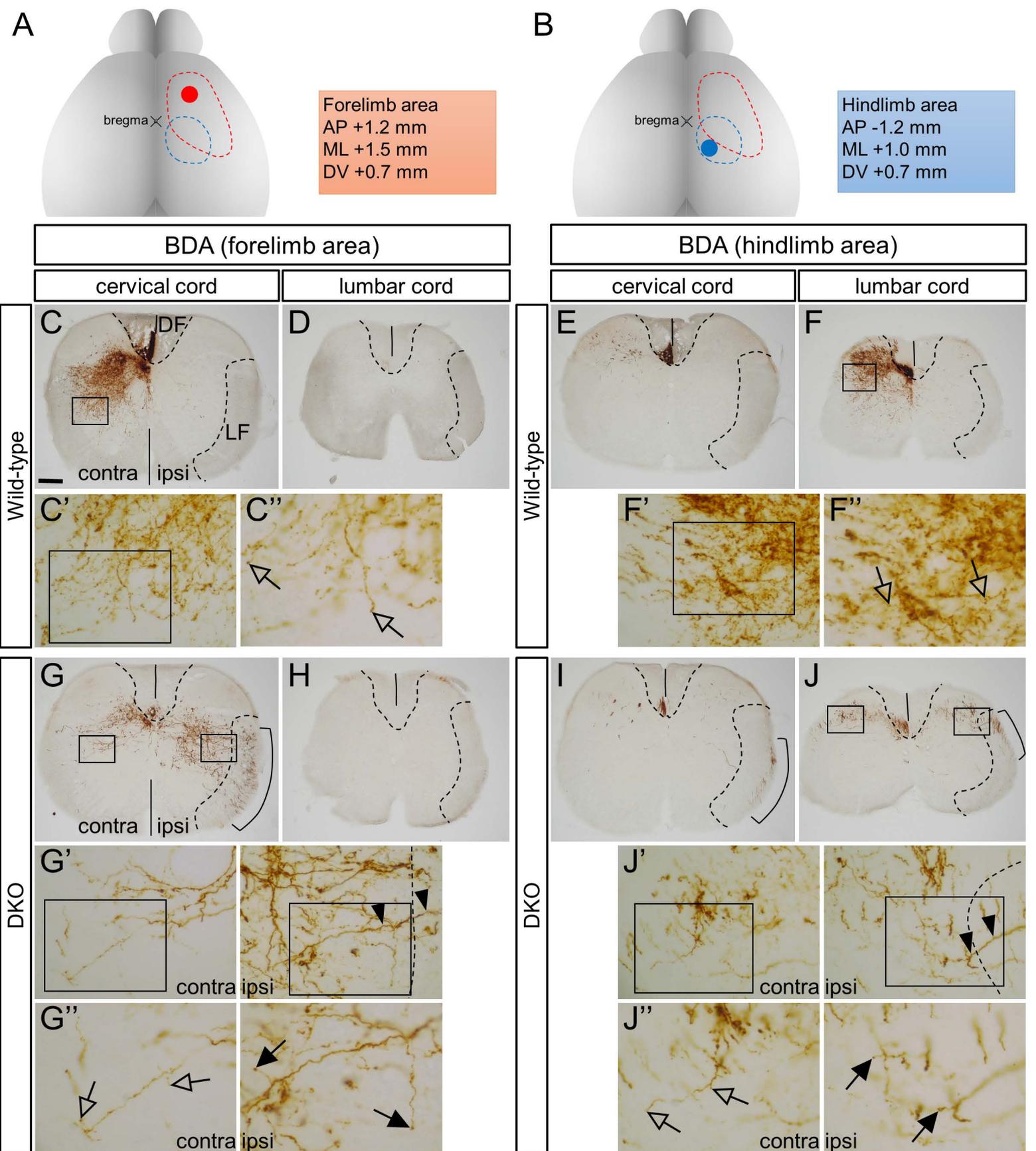


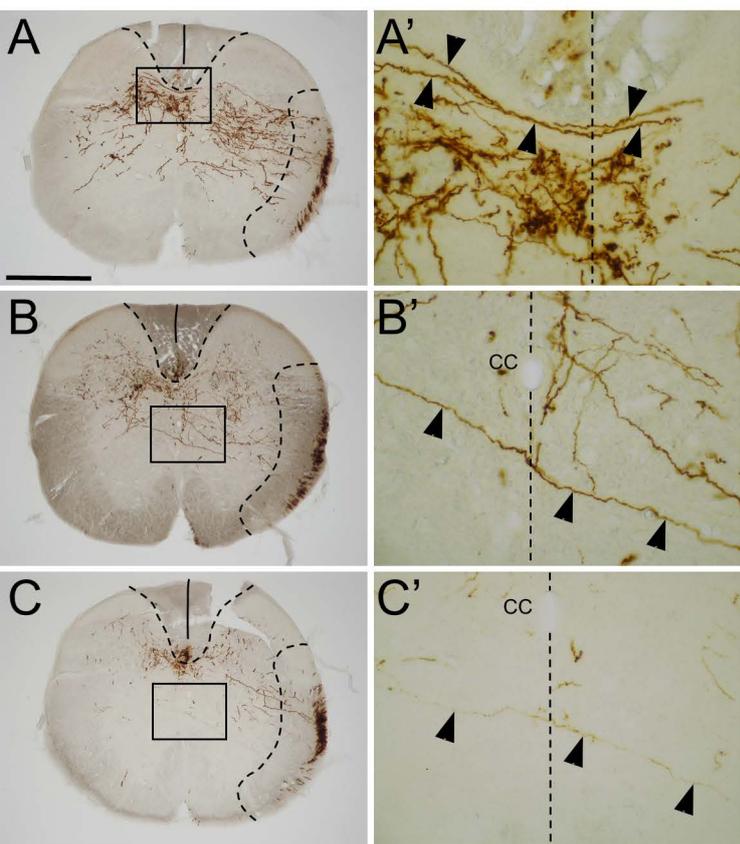


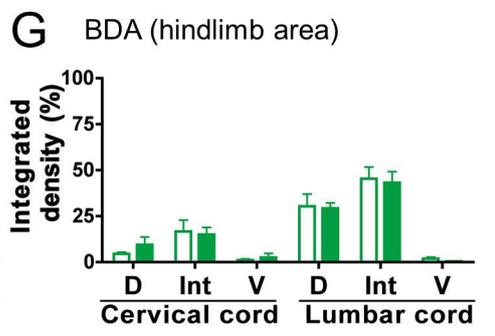
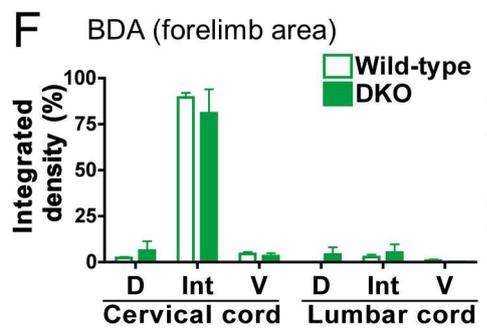
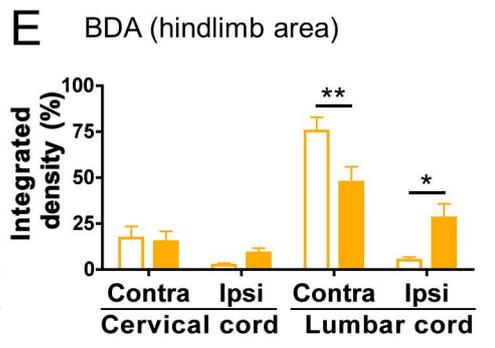
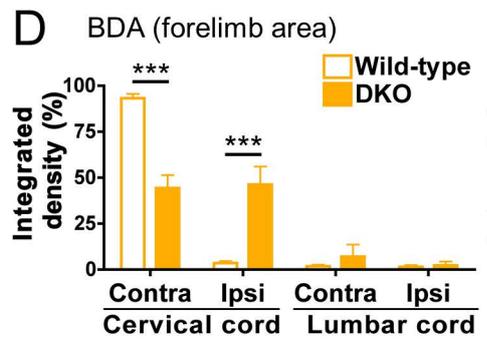
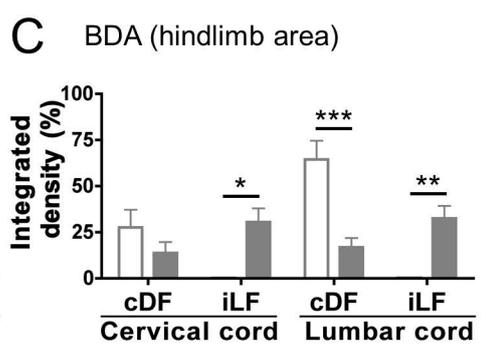
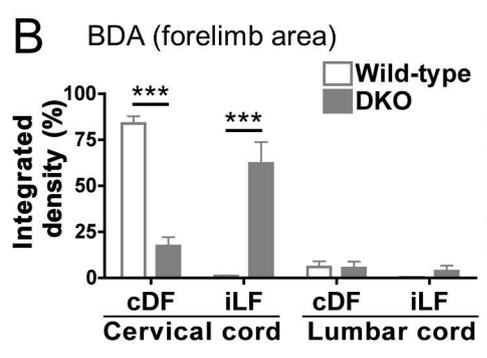
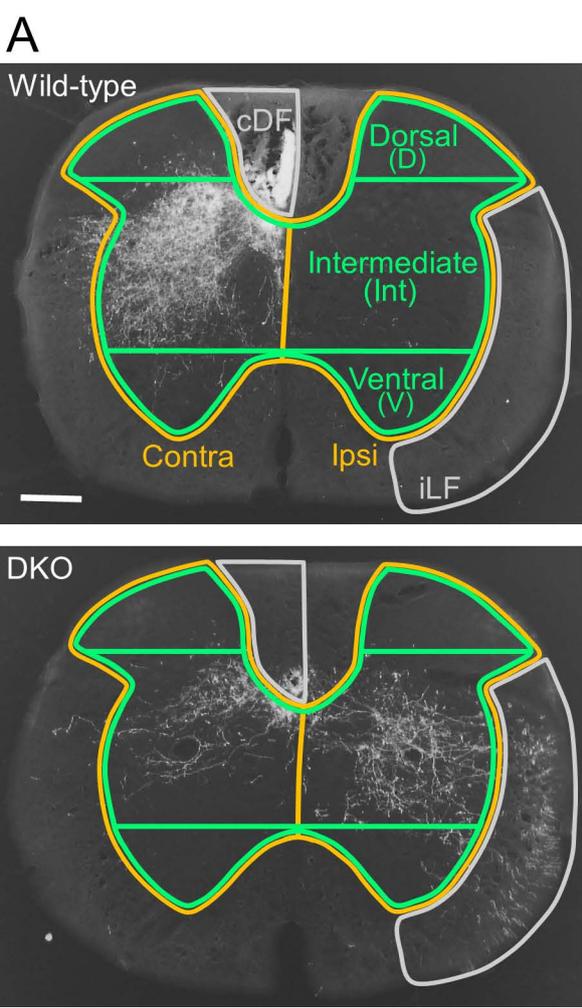


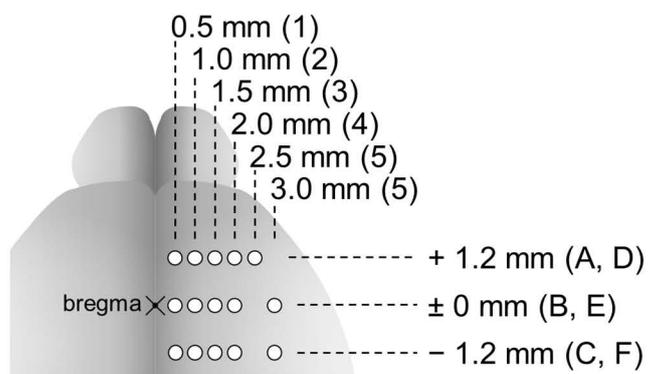




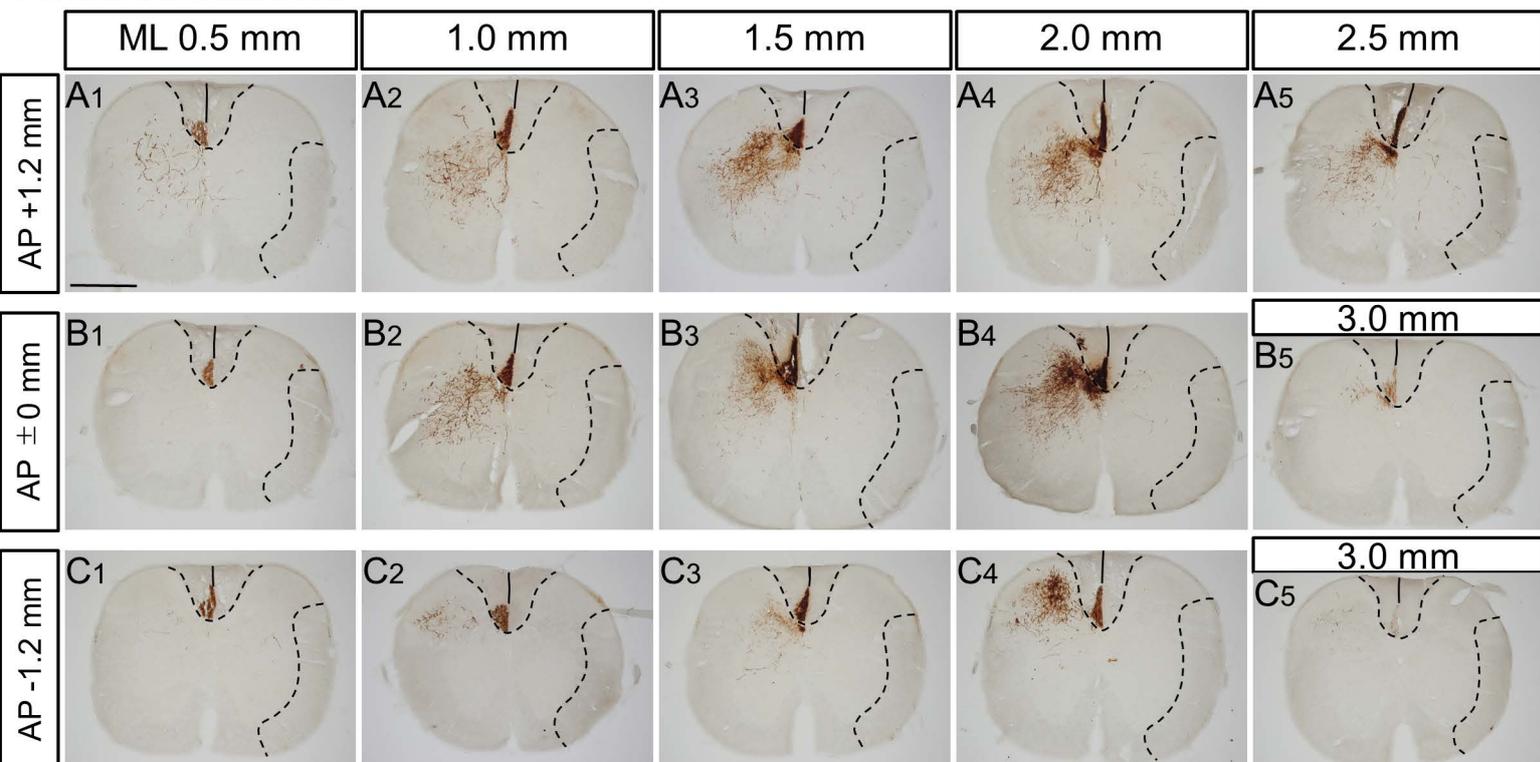




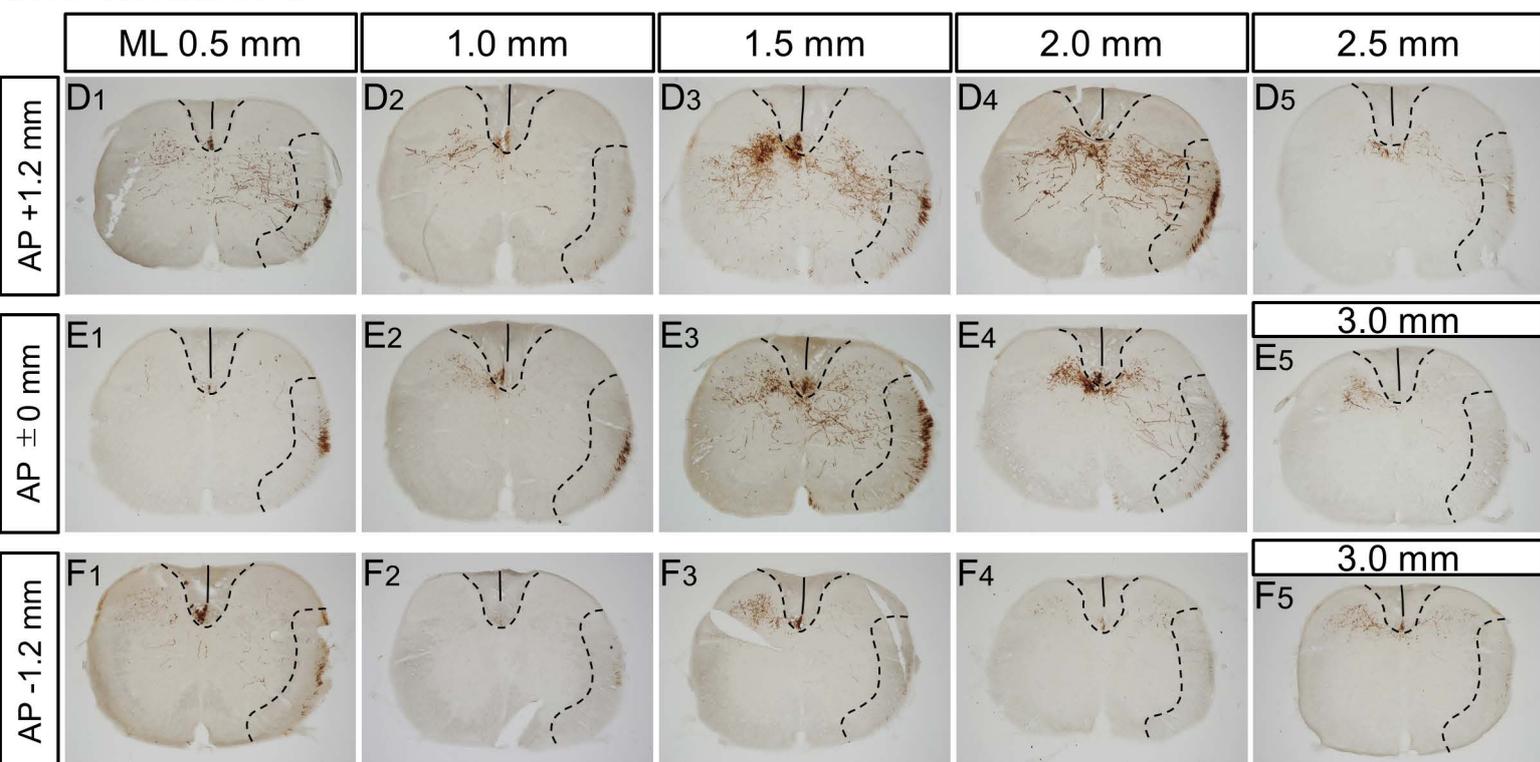




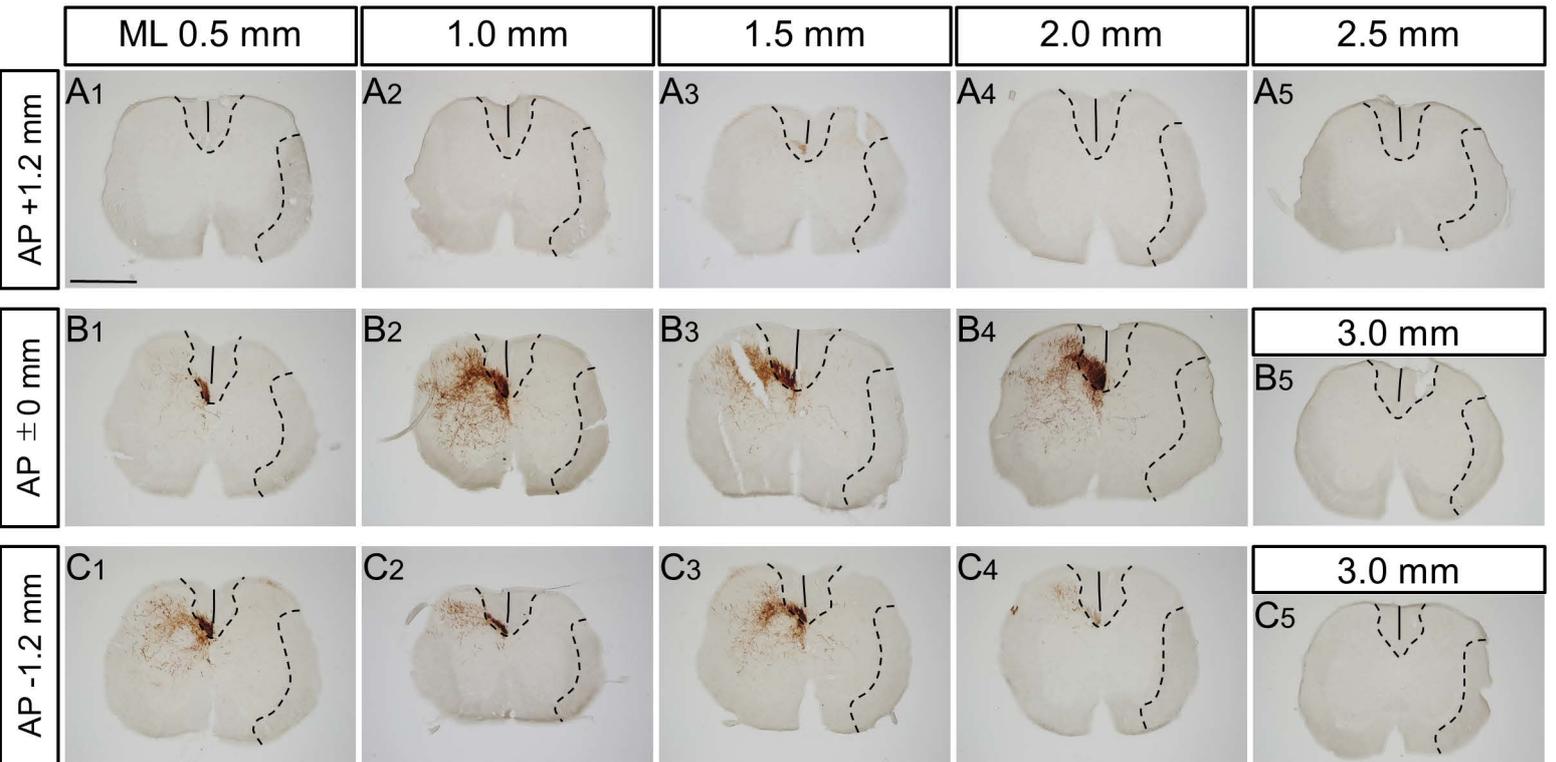
Control cervical cord



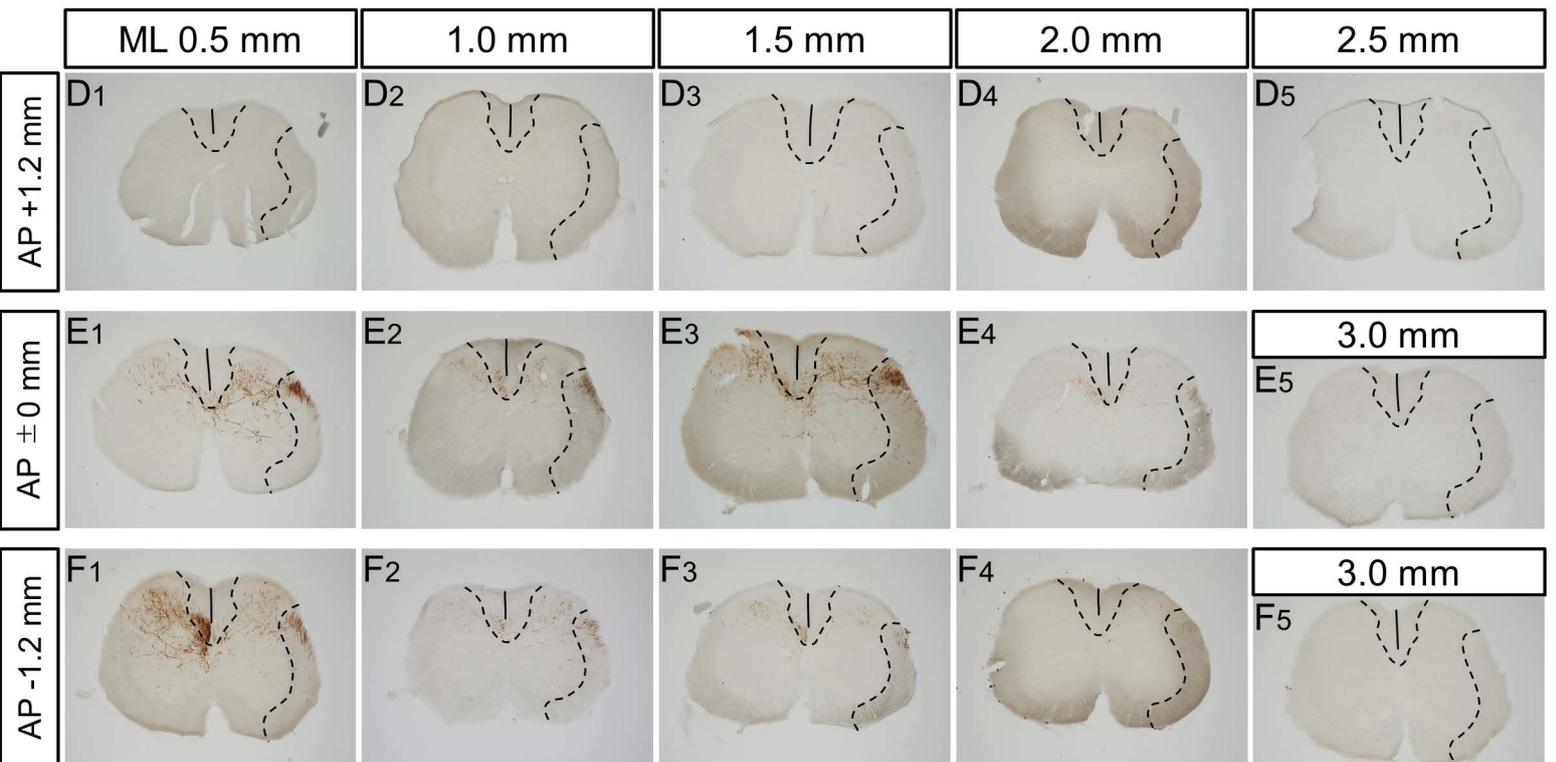
DKO cervical cord

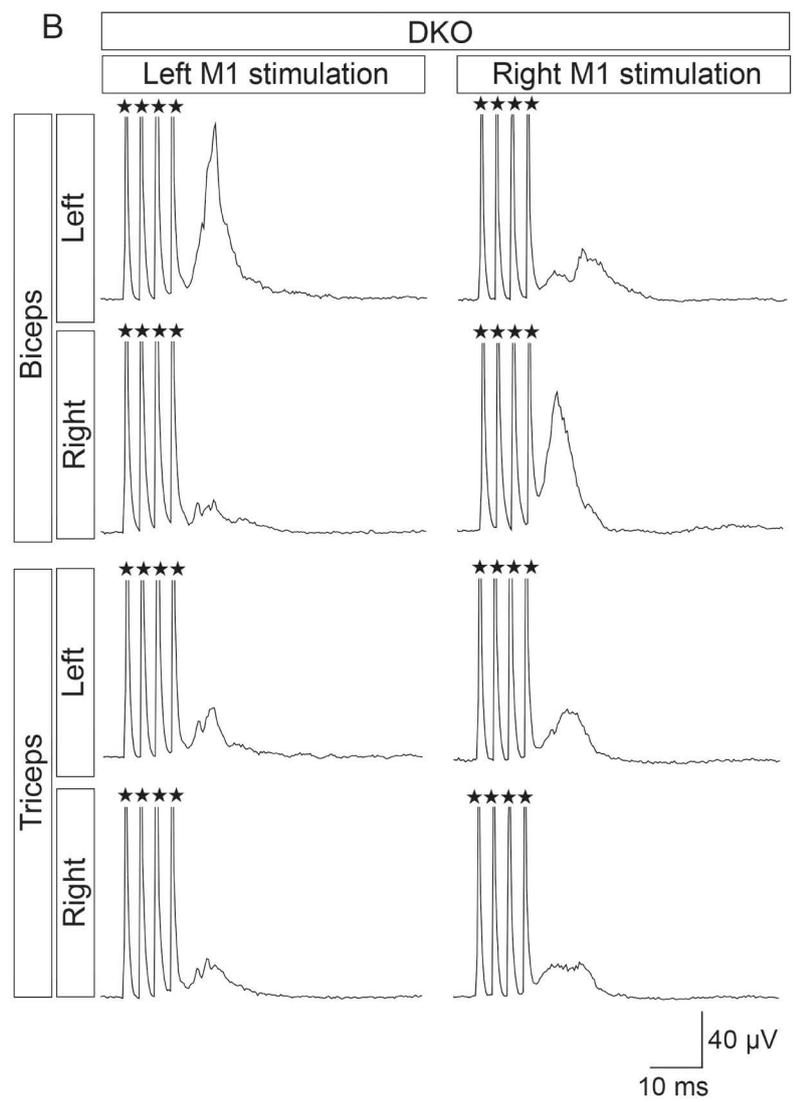
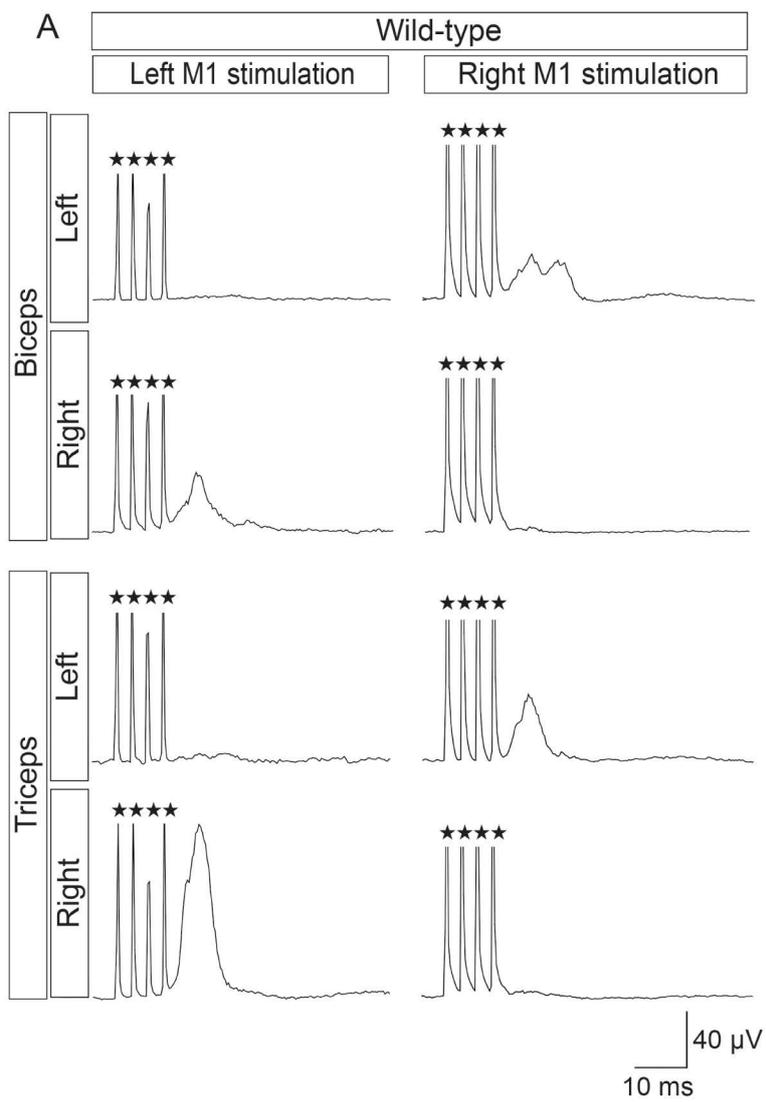


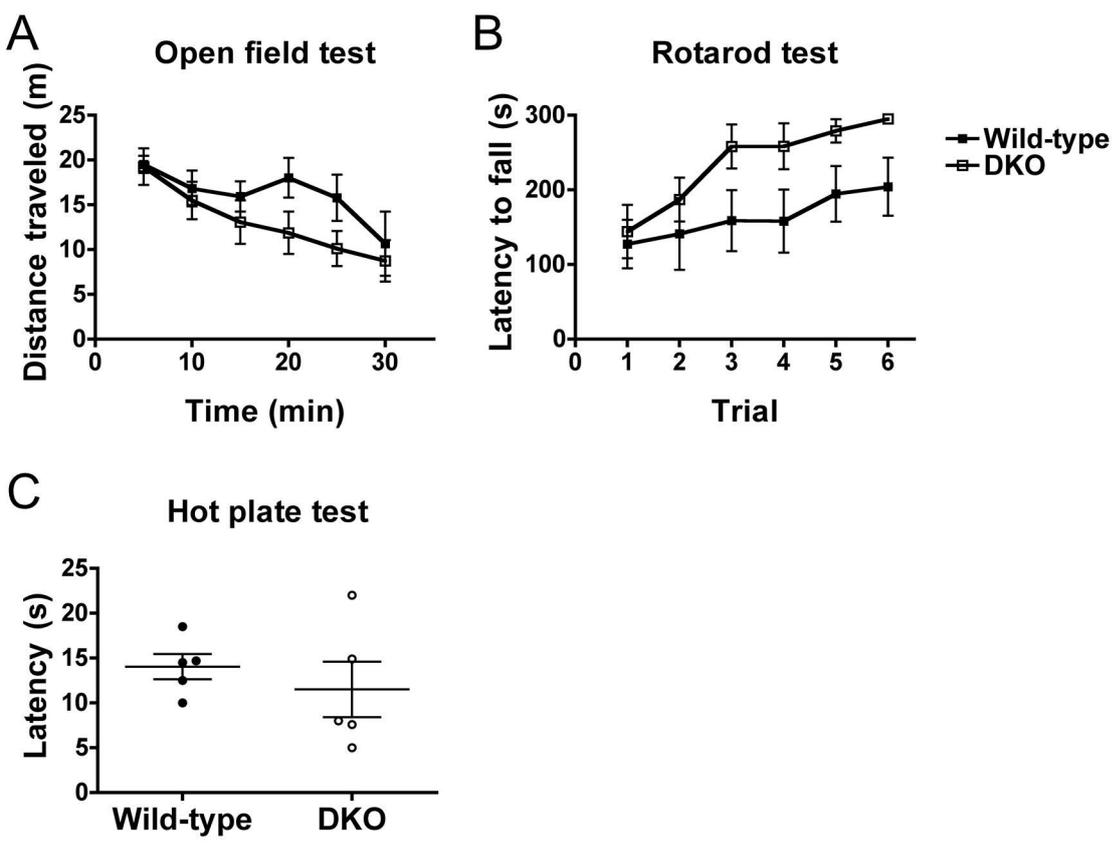
Control lumbar cord

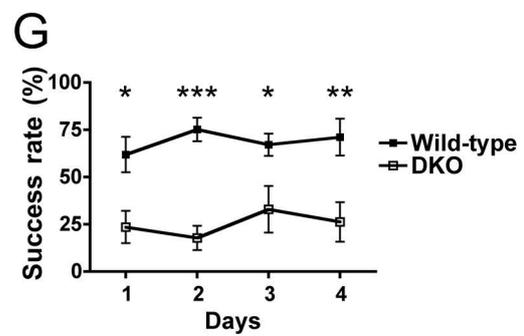
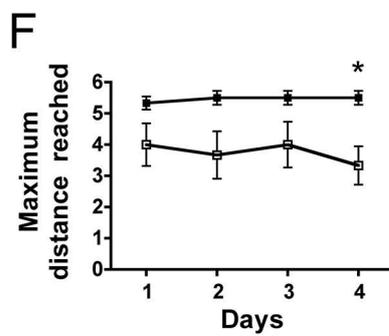
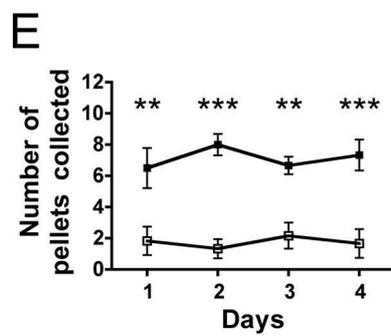
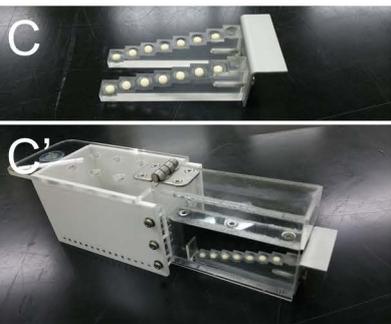
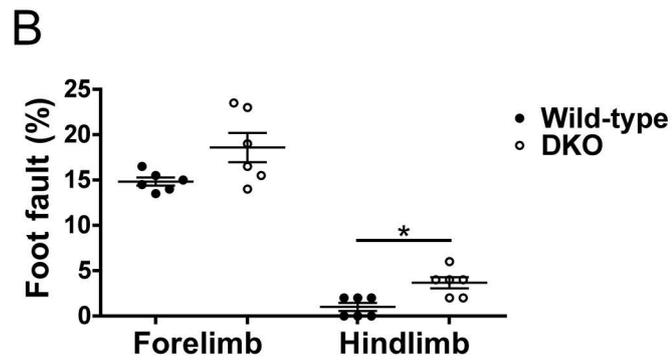


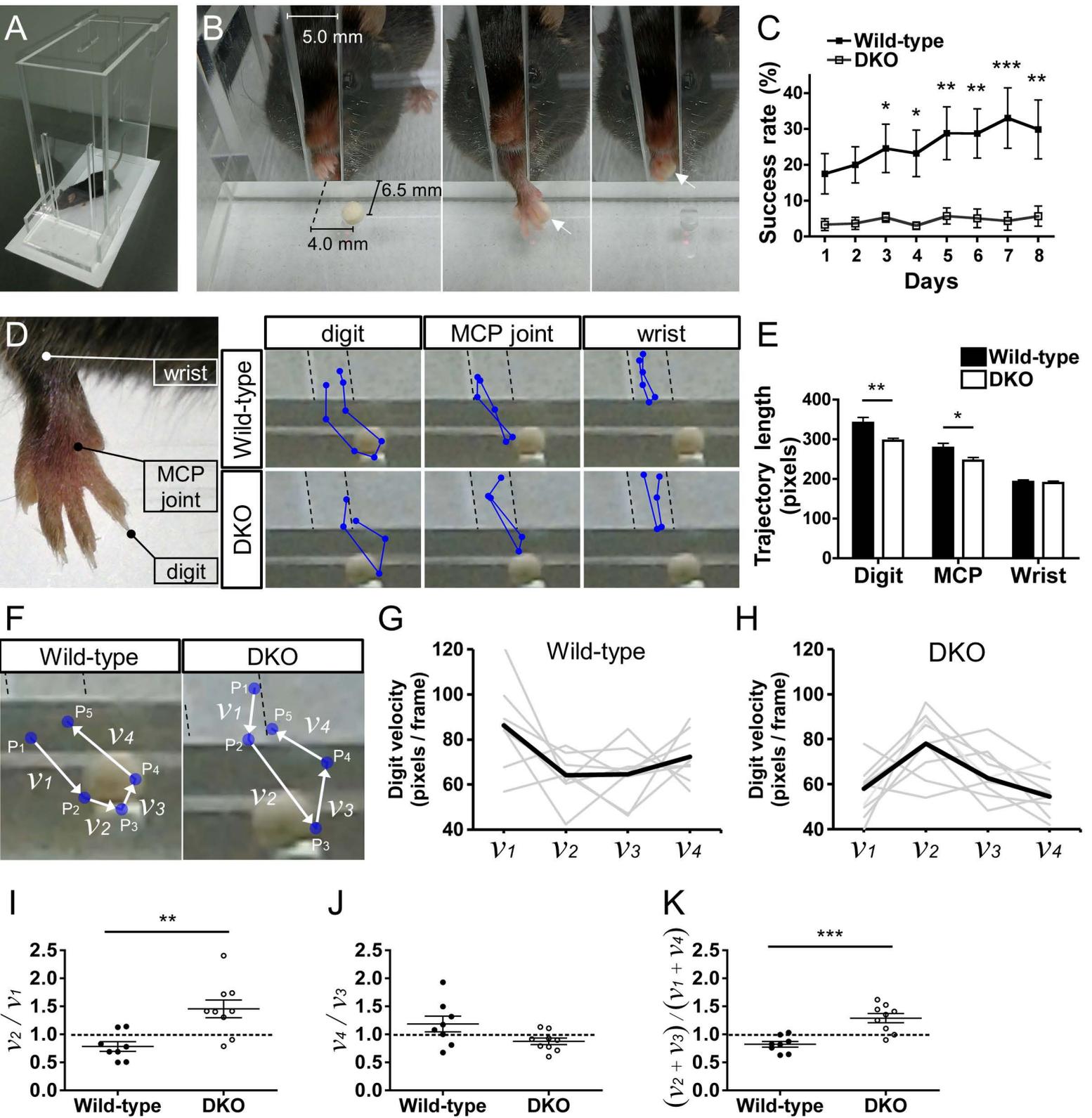
DKO lumbar cord



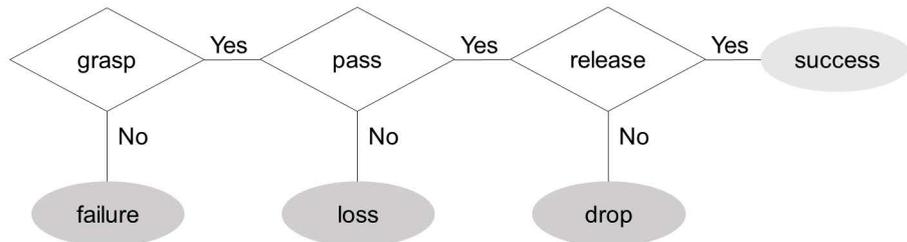




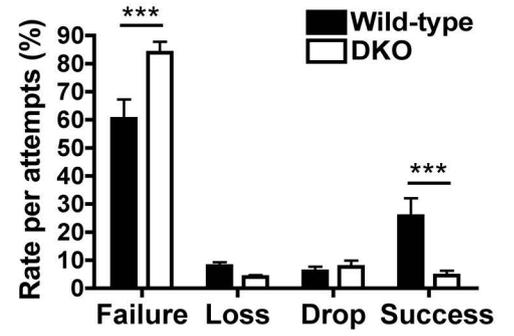




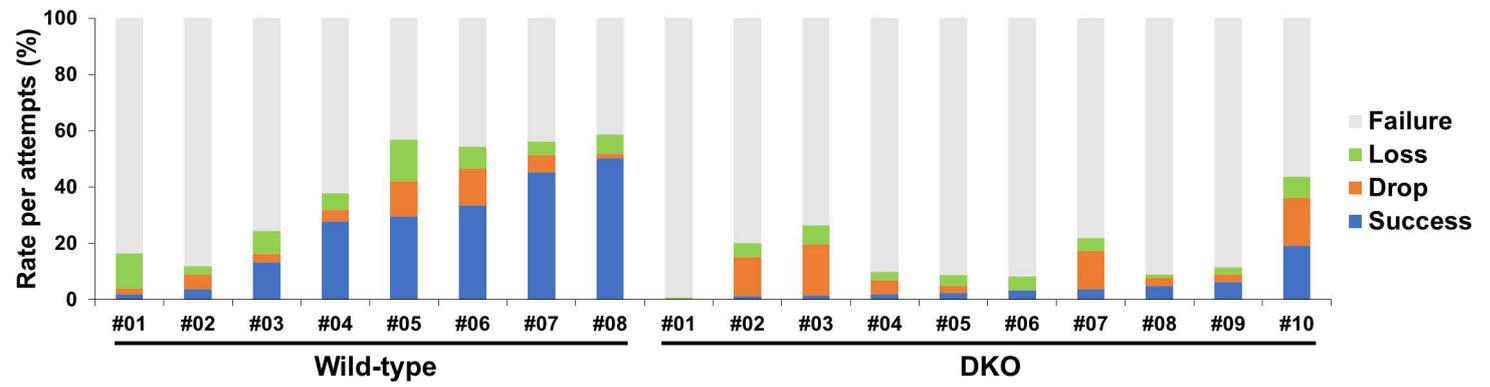
A



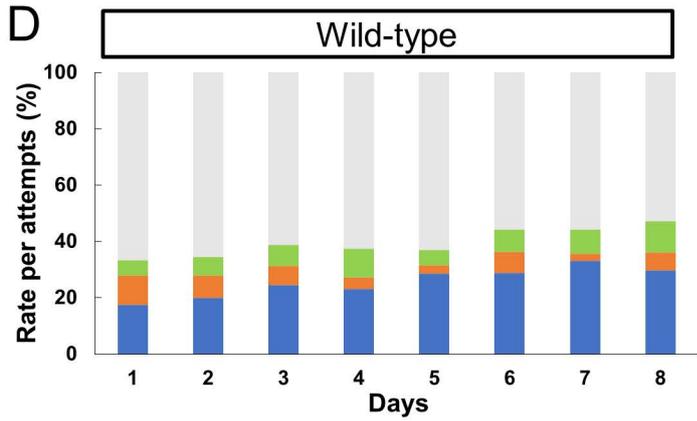
B



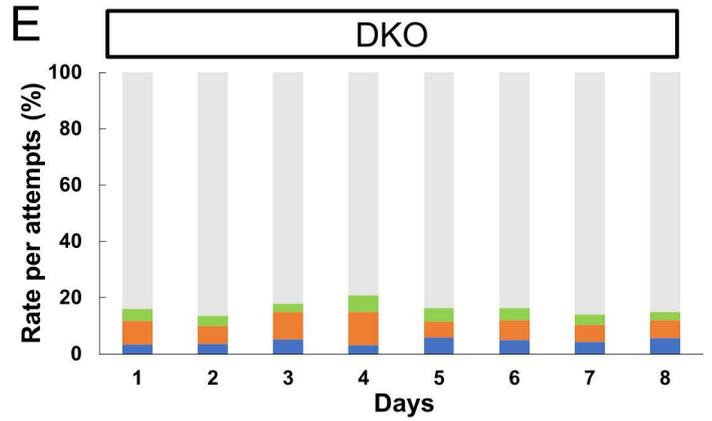
C



D



E



# 表 1

SUPPLEMENTARY TABLE 1. Summary of BDA tracing of CST fibers

Mouse ID	Genotype	Age (weeks)	Sex	Stereotaxic coordinates (mm)			BDA ( $\mu$ l)	Midbrain			SC	Pyramidal decussation			
				AP	ML	DV		Projection (*1)	Defasc. (*2)	Loop (*3)	Bundle (*4)	cDF (*5)	iDF (*6)	iLF (*7)	iVF (*8)
95	WT	20	M	$\pm 0$	+1.2	+0.7	0.5	-	-	-	-	+	-	-	$\pm$
97	WT	20	M	$\pm 0$	+1.2	+0.7	0.5	-	-	-	-	+	-	$\pm$	-
98	WT	20	M	$\pm 0$	+1.2	+0.7	0.5	-	-	-	-	+	-	-	-
99	WT	20	M	$\pm 0$	+1.2	+0.7	0.5	-	-	-	-	+	-	$\pm$	-
109 (*9)	WT	20	M	$\pm 0$	+1.2	+0.7	0.5	-	-	-	-	+	-	-	-
104	WT	25	F	$\pm 0$	+1.2	+0.7	0.5	-	-	-	-	+	-	-	-
91	WT	29	M	$\pm 0$	+1.2	+0.7	0.5	-	-	-	-	+	-	-	-
92	WT	29	M	$\pm 0$	+1.2	+0.7	0.5	-	-	-	-	+	-	-	-
67	WT	34	M	$\pm 0$	+1.2	+0.7	0.5	-	-	-	-	+	$\pm$	-	-
122	WT	28	M	+1.2	+1.5	+0.7	0.5	-	-	-	-	+	-	-	-
66	WT	31	M	+1.2	+1.5	+0.7	0.5	-	-	-	-	+	-	-	-
84	WT	39	M	+1.2	+1.5	+0.7	0.5	-	-	-	-	+	-	-	-
137	WT	30	M	-1.2	+1.0	+0.7	0.5	-	-	-	-	+	-	-	-
139	WT	30	M	-1.2	+1.0	+0.7	0.5	-	-	-	-	+	$\pm$	-	$\pm$
68	WT	37	F	-1.2	+1.0	+0.7	0.5	-	-	-	-	+	-	-	-
188	DKO	9	M	$\pm 0$	+1.2	+0.7	0.5	+	-	+	+	+	-	+	$\pm$
88	DKO	17	M	$\pm 0$	+1.2	+0.7	0.5	+	+	+	-	+	-	+	$\pm$
174	DKO	26	M	$\pm 0$	+1.2	+0.7	0.5	-	-	+	-	+	-	+	-
175	DKO	26	M	$\pm 0$	+1.2	+0.7	0.5	-	-	+	-	+	-	+	$\pm$
177	DKO	26	M	$\pm 0$	+1.2	+0.7	0.5	-	-	+	+	+	$\pm$	+	-
176	DKO	27	M	$\pm 0$	+1.2	+0.7	0.5	-	+	+	+	+	-	+	-
85 (*10)	DKO	31	M	$\pm 0$	+1.2	+0.7	0.5	-	+	+	+	+	$\pm$	+	-
112	DKO	32	F	$\pm 0$	+1.2	+0.7	0.5	+	-	+	+	+	-	+	-
115 (*11)	DKO	35	M	$\pm 0$	+1.2	+0.7	0.5	-	-	+	+	+	+	+	$\pm$
119	DKO	41	F	$\pm 0$	+1.2	+0.7	0.5	+	+	+	-	$\pm$	-	+	$\pm$
114	DKO	44	F	$\pm 0$	+1.2	+0.7	0.5	+	-	+	+	+	$\pm$	+	-
90	DKO	17	M	+1.2	+1.5	+0.7	0.5	-	-	+	-	$\pm$	-	+	$\pm$
184	DKO	23	M	+1.2	+1.5	+0.7	0.5	+	-	+	-	+	-	+	-
183	DKO	25	M	+1.2	+1.5	+0.7	0.5	+	+	+	+	+	$\pm$	+	$\pm$
87	DKO	39	M	+1.2	+1.5	+0.7	0.5	+	+	+	+	+	$\pm$	+	-
128	DKO	45	F	+1.2	+1.5	+0.7	0.5	-	+	+	-	+	-	+	-
89	DKO	26	M	-1.2	+1.0	+0.7	0.5	-	-	+	-	$\pm$	-	+	-
171	DKO	28	M	-1.2	+1.0	+0.7	0.5	+	-	+	-	+	$\pm$	+	$\pm$
172	DKO	28	F	-1.2	+1.0	+0.7	0.5	+	-	+	+	+	-	+	-
173	DKO	28	F	-1.2	+1.0	+0.7	0.5	+	+	+	+	+	-	+	-
86	DKO	39	M	-1.2	+1.0	+0.7	0.5	-	+	+	+	+	$\pm$	+	$\pm$

F, female; M, male; SC, superior colliculus. AP, anterior-posterior; ML, medial-lateral; DV, dorsal-ventral.

(+), present; ( $\pm$ ), a few; (-), absent.

\*1, Abnormal projection through the thalamus (see Figure 1B<sub>2</sub>-E<sub>2</sub>', arrowheads; the same abnormality seen in Figure B<sub>2</sub>-E<sub>2</sub>)

\*2, Defasciculation of the CST fibers in the cerebral peduncle (see Figure 4E, arrowheads)

\*3, Abnormal looping of the CST fibers in the midbrain (see Figure 4C, 4E; arrows)

\*4, Bundles that traverse in the superior colliculus (see Figure 3F<sub>2</sub>', F<sub>2</sub>''; arrowheads)

\*5, cDF, contralateral dorsal funiculus (see Figure 3H<sub>2</sub>-3I<sub>2</sub>, open arrowheads)

\*6, iDF, ipsilateral dorsal funiculus (see Figure 3H<sub>2</sub>-3I<sub>2</sub>, blue arrowheads)

\*7, iLF, ipsilateral lateral funiculus (see Figure 3G<sub>2</sub>-3I<sub>2</sub>, black arrowheads)

\*8, iVF, ipsilateral ventral funiculus (see Figure 3H<sub>2</sub>, red arrowheads)

\*9, The wild-type mouse shown in Figures 3 and 4.

\*10, The DKO mouse shown as DKO #2 in Figure 4.

\*11, The DKO mouse shown in Figure 3 and in Figure 4 (DKO #1).